

**Etablierung einer Ko-Kultur von Alveolarepithel und
Mikrovaskulärem Endothel als *in vitro* Modell einer
humanen respiratorischen Einheit**

Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

Maria Iris Hermanns
geb. in Monschau

Mainz, im September 2005

Tag der mündlichen Prüfung: 8. November 2005

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Hermanns MI, Unger RE, Kehe K, Peters K, Kirkpatrick CJ. Lung epithelial cell lines in co-culture with human pulmonary microvascular endothelial cells: development of an alveolo-capillary barrier *in vitro*. Lab Invest 2004; 84: 736-752

Publizierte Kurzreferate

Hermanns MI, Fuchs S, Unger RE, Kirkpatrick CJ. An *in vitro* co-culture model of the human alveolo-capillary barrier to study the pathogenesis of lung injury. FASEB J 2005; 19 (5): A 1535-1536

Hermanns MI, Kehe K, Unger RE, Fuchs S, Kirkpatrick CJ. Acute effects of cadmium on a human distal lung barrier *in vitro*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 2005; 371 Suppl 1: R125

Hermanns MI, Fuchs S, Unger RE, Peters K, Kirkpatrick CJ. A co-culture model of a human lung-blood barrier *in vitro*: 24-well-screening of barrier properties. FASEB J 2004; 18 (4): A 185

Hermanns MI, Ma SC, Unger RE, Fuchs S, Saltzman WM, Kirkpatrick CJ. Uptake of PLGA-microspheres by human distal lung epithelium and endothelium: A co-culture model for drug/gene delivery. Transactions of the 7th World Biomaterials Congress 2004, Sydney, Australia, 17-21 May 2004, p 1814

Hermanns MI, Fuchs S, Unger RE, Peters K, Kirkpatrick CJ. A reproducible co-culture model of the human distal lung barrier: 24-well-screening for pulmonary toxicology *in vitro*. ALTEX 2004; 21(3):159

Hermanns MI, Kehe K, Unger RE, Peters K, Fuchs S, Kirkpatrick CJ. Development of co-culture models of a human lung-blood barrier to study pulmonary toxicology. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 2004; 369 Suppl 1:R139

Hermanns MI, Unger RE, Peters K, Bittinger F, Kirkpatrick CJ. *In vitro* co-culture methods to simulate the alveolo-capillary unit of the human lung. Molec Biol Cell 2002; 13 Suppl: 77a

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	4
1 EINLEITUNG.....	7
1.1 DIE TERMINALE RESPIRATORISCHE EINHEIT	7
1.2 DAS ALVEOLAREPITHEL	9
1.2.1 Alveolarepithelzellen vom Typ I (ATI Zellen).....	9
1.2.2 Alveolarepithelzellen vom Typ II (ATII Zellen).....	9
1.3 DAS KAPILLARENDOTHEL	10
1.4 DIE ALVEOLO-KAPILLÄRE EINHEIT	10
1.5 INFLAMMATORISCHE ZYTOKINE UND CHEMOKINE BEI AKUTER, ENTZÜNDLICHER LUNGENERKRANKUNG.....	12
1.6 ZELLKULTURMODELLE DER ALVEOLO-KAPILLÄREN EINHEIT	14
1.7 TRANSDIFFERENZIERUNG VON TYP II ZU TYP I ALVEOLAREPITHELZELLEN <i>IN VITRO</i>	15
1.8 MARKER FÜR ALVEOLAREPITHELZELLEN VOM TYP I	16
1.9 CHARAKTERISTISCHE EIGENSCHAFTEN VON ALVEOLAREPITHELZELLEN VOM TYP II	17
1.10 AUFRECHTERHALTUNG EINES DIFFERENZIIERTEN PHÄNOTYPS <i>IN VITRO</i>	19
1.11 CHARAKTERISTISCHE EIGENSCHAFTEN DES KAPILLARENDOTHEL.....	20
1.12 ZELL-LINIEN.....	23
1.12.1 Endotheliale Zell-Linien.....	24
1.12.2 Epitheliale Zell-Linien.....	24
1.13 AUFBAU EINER INTAKTEN BARRIERE <i>IN VITRO</i>	25
1.13.1 Interzelluläre Verbindungen (Junktionen).....	25
1.13.2 Regulation der Barriere (Integrität und Dysfunktion).....	26
1.13.3 Nachweismethoden des Aufbaus einer zellulären Barriere.....	29
2 MATERIAL UND METHODEN.....	32
2.1 CHEMIKALIEN UND GERÄTE	32
2.1.1 Chemikalien.....	32
2.1.2 Enzyme und Chemikalien zur Zelldissoziation	33
2.1.3 Antikörper	34
2.1.3.1 Antikörper zur immunzytochemischen Charakterisierung	34
2.1.3.2 Antikörper zur immunomagnetischen Zellseparation.....	37
2.1.4 ABC-Komplex.....	37
2.1.5 ELISA-Kits zur Messung der biosynthetischen Aktivität	37
2.1.6 Chromogene	37
2.1.7 Medien und Supplemente zur Kultivierung von Endothel- und Epithelzellen	38
2.1.8 Wachstumsfaktoren	39
2.1.9 Reagenzien für die Molekularbiologie	39
2.1.10 Reagenzien für Western Blots.....	39
2.1.11 Geräte.....	40
2.2 ABLÖSEN VON ZELLEN	41
2.3 FIXIERUNG VON ZELLEN	42
2.4 BESCHICHTUNG DER KULTUROBERFLÄCHE	42
2.5 ISOLIERUNG VON HUMANEN TYP II ALVEOLAREPITHELZELLEN	43
2.5.1 Histologie des Lungengewebes nach Enzymbehandlungen.....	45
2.5.2 Identifizierung und Quantifizierung der isolierten Epithelzellen	45
2.5.3 Positive Selektion der Zielzellen: Zellseparation mit Hilfe von CD44v6-Beads	46
2.5.4 Charakterisierung der isolierten Zellen.....	47
2.6 ISOLIERUNG VON HUMANEN PULMONALEN MIKROVASKULÄREN ENDOTHELZELLEN.....	48
2.7 MONOKULTUR	48
2.7.1 Untersuchung der Kulturbedingungen für primär isolierte Zellen (HPMEC, hATII).....	48
2.7.2 Entwicklung der Kulturbedingungen für die Ko-Kultivierung der Zell-Linien	48
2.7.3 Bestimmung der Proliferation der Zellen mittels Zellzählung am CASY I.....	49
2.8 NACHWEIS VON DIFFERENZIERUNGSMARKERN MITTELS IMMUNFLUORESCENZ	49
2.9 WESTERN-BLOT	50
2.10 NACHWEIS DER MRNA-EXPRESSION MITTELS RT-PCR.....	52
2.11 ELEKTRONENMIKROSKOPIE	55
2.12 NACHWEIS SEKUNDÄRER INFLAMMATORISCHER MEDIATOREN MITTELS ELISA	56

2.13	BESTIMMUNG DER ZELLADHÄSIONSMOLEKÜLE (CAMs) MITTELS EIA UND ELISA.....	58
2.13.1	ELISA zum Nachweis von sICAM-1 und sVCAM-1.....	58
2.13.2	CAM-EIA zum Nachweis membranständiger Adhäsionsmoleküle.....	58
2.13.3	Messung der Gesamtproteinmenge durch Färbung mit Kristallviolett.....	59
2.14	ETABLIERUNG DES KO-KULTURMODELLS.....	59
2.14.1	Kultivierung auf HTS 24-Transwell Filterplatten.....	59
2.14.2	TER-Messung.....	61
2.14.3	Parazellulärer Transport von Natrium-Fluoreszein.....	62
2.15	STATISTIK.....	62
3	ERGEBNISSE.....	63
3.1	ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON HUMANEN ALVEOLOAREPITHELZELLEN VOM TYP II.....	63
3.1.1	Isolierung von ATII Zellen.....	63
3.1.2	Phänotypische Charakterisierung der isolierten ATII Zellen.....	64
3.2	UNTERSUCHUNG DER KULTURBEDINGUNGEN FÜR PRIMÄR ISOLIERTE ZELLEN (HPMEC, hATII)....	69
3.2.1	Charakterisierung von hATII Zellen in Abhängigkeit vom Serumgehalt.....	69
3.2.2	Wachstumsverhalten von hATII in serumfreien synthetischen Kulturmedien.....	71
3.2.3	Charakterisierung der hATII* Zellen im Verlaufe der Passagen.....	72
3.2.4	Isolierung der CD44v6 positiven Zellen.....	76
3.2.5	Morphologischer Phänotyp von CD44v6 positiven Zellen in verschiedenen Medien mit und ohne Serum bzw. Dexamethason.....	80
3.3	ENTWICKLUNG DER GEMEINSAMEN KULTURBEDINGUNGEN FÜR ZELL-LINIEN IN MONO-KULTUR.....	83
3.4	CHARAKTERISIERUNG DER MONO-KULTUR IM KO-KULTURMEDIUM.....	84
3.4.1	Morphologie von ISO-HAS-1, A549, NCI H441 und NCI H820.....	84
3.4.2	Phänotypische Merkmale der endothelialen und epithelialen Zell-Linien.....	85
3.4.3	Einfluss von Dexamethason auf Proliferation und Differenzierung von NCI H441.....	92
3.4.3.1	Bestimmung der Zellzahl im Verlauf der Kultur mit Dexamethason.....	92
3.4.3.2	Wirkung von Dexamethason auf die Freisetzung von Wachstumsfaktoren.....	93
3.4.3.3	Expression von Differenzierungsmarkern im Verlauf der Kultur mit Dexamethason.....	95
3.5	VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN DER EPITHELZELLEN IN MONO-KULTUR: STIMULATION MIT ZYTOKINEN UND LPS.....	96
3.5.1	Expression von Zelladhäsionsmolekülen (Cell Adhesion Molecules, CAMs).....	96
3.5.1.1	Einfluss von Serum und Dexamethason auf die Expression von ICAM-1 bei hATII*.....	96
3.5.1.2	Zeitverlauf der ICAM-1 und VCAM-1-Expression nach Stimulation.....	98
3.5.1.3	Nachweis der Expression von VCAM-1 mRNA mittels RT-PCR.....	102
3.5.1.4	Expression von ICAM-1 bei Kultivierung in verschiedenen Medien.....	103
3.5.2	Freisetzung sekundärer inflammatorischer Mediatoren.....	103
3.6	VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN DER ENDOTHELZELLEN IN MONO-KULTUR: STIMULATION MIT ZYTOKINEN UND LPS.....	109
3.6.1	Expression von Zelladhäsionsmolekülen (Cell Adhesion Molecules, CAMs).....	109
3.6.1.1	Zeitverlauf der ICAM-1 und VCAM-1-Expression nach Stimulation (CAM-EIA).....	109
3.6.1.2	Vergleich der Freisetzung löslicher CAMs bei HPMEC und ISO-HAS-1.....	111
3.6.2	Freisetzung sekundärer inflammatorischer Mediatoren.....	112
3.7	ETABLIERUNG DES KO-KULTURMODELLS.....	115
3.7.1	Art der Membraneinsätze und Notwendigkeit einer Matrixbeschichtung.....	115
3.7.2	Ermittlung der optimalen Aussaatdichte.....	116
3.7.3	Aufbau des Ko-Kulturmodells.....	116
3.8	KO-KULTUR: EPITHELZELL-LINIEN (A549/H441) MIT ISO-HAS-1.....	118
3.8.1	Transzellulärer elektrischer Widerstand (TER) in serumhaltigem Medium nach Stimulation mit Dexamethason.....	118
3.8.2	Transzellulärer elektrischer Widerstand (TER) in serumfreiem Medium mit und ohne Dexamethason.....	120
3.8.3	Proliferation und Expression von Differenzierungsmarkern im Verlauf der Ko-Kultur.....	122
3.8.4	Elektronenmikroskopische Untersuchung der etablierten Ko-Kulturen.....	124
3.9	KO-KULTUR: EPITHELZELL-LINIEN (A549/H441) MIT HPMEC.....	125
3.9.1	Transzellulärer elektrischer Widerstand (TER) im Verlaufe der Kultur nach Stimulation mit Dexamethason.....	125
3.9.2	Proliferation und Expression von Differenzierungsmarkern im Verlauf der Ko-Kultur.....	126
3.9.3	Elektronenmikroskopische Untersuchung der etablierten Ko-Kulturen.....	128
3.10	PARAZELLULÄRER TRANSPORT VON NATRIUM-FLUORESZEIN.....	130

3.11	KO-KULTUR VON PRIMÄRZELLEN: hATII MIT HPMEC	131
3.11.1	<i>Transzellulärer elektrischer Widerstand (TER) und morphologischer Phänotyp der passagierten hATII* in serumfreien synthetischen Kulturmedien</i>	131
3.11.2	<i>Ko-Kultur von hATII* (P1) mit HPMEC</i>	134
3.11.3	<i>Ko-Kultur von hATII* (P2) mit HPMEC</i>	138
3.11.4	<i>Ko-Kultur von hATII (P0) mit HPMEC</i>	140
3.12	FUNKTIONELLE UNTERSUCHUNG DER ETABLIERTEN KO-KULTUREN	145
3.12.1	<i>Stimulation mit TNF-α</i>	145
3.12.1.1	TER-Werte nach Stimulation mit TNF- α	145
3.12.1.2	Expression von Zell-Zell-Kontaktmolekülen nach Stimulation mit TNF- α	146
3.12.1.3	Parazellulärer Transport von Natrium-Fluoreszein nach Stimulation mit TNF- α	147
3.12.2	<i>Stimulation der Ko-Kultur mit TNF-α und IFN-γ</i>	148
3.12.2.1	TER-Werte nach Stimulation der Ko-Kultur mit TNF- α und IFN- γ	148
3.12.2.2	Parazellulärer Transport von Natrium-Fluoreszein bei Stimulation mit TNF- α und IFN- γ	150
3.12.2.3	Expression von Zelladhäsionsmolekülen (Cell Adhesion Molecules, CAMs).....	152
3.12.2.4	Freisetzung sekundärer inflammatorischer Mediatoren.....	155
3.12.3	<i>Stimulation der Ko-Kultur von Epithelzellisolaten (P0) und HPMEC mit TNF-α und IFN-γ</i>	159
3.12.3.1	TER-Werte nach Stimulation der primären Ko-Kultur mit TNF- α und IFN- γ	159
3.12.3.2	Parazellulärer Transport von Natrium-Fluoreszein bei Stimulation mit TNF- α und IFN- γ	160
3.12.3.3	Expression von Zelladhäsionsmolekülen (Cell Adhesion Molecules, CAMs).....	161
3.12.3.4	Freisetzung sekundärer inflammatorischer Mediatoren.....	163
4	DISKUSSION	167
4.1	ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG HUMANER ALVEOLAREPITHELZELLEN VOM TYP II.....	167
4.2	EINFLUSS VON DEXAMETHASON UND SERUM AUF DIE CD44v6 POSITIVEN ZELLEN	171
4.3	CHARAKTERISIERUNG DER ENDOTHELIALEN UND EPITHELIALEN ZELL-LINIEN IN KO-KULTURMEDIUM	172
4.4	EINFLUSS VON DEXAMETHASON AUF DIE EIGENSCHAFTEN VON A549, NCI H441 UND NCI H820.....	174
4.5	VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNG DER EPITHELZELLEN IN MONO-KULTUR: CAM-EXPRESSION UND FREISETZUNG SEKUNDÄRER INFLAMMATORISCHER MEDIATOREN.....	176
4.6	VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNG DER ENDOTHELZELLEN IN MONO-KULTUR: CAM-EXPRESSION UND FREISETZUNG SEKUNDÄRER INFLAMMATORISCHER MEDIATOREN.....	180
4.7	ETABLIERUNG EINER FUNKTIONELLEN BARRIERE: KO-KULTUREN VON EPITHELZELL-LINIEN (A549/H441) MIT ISO-HAS-1 UND HPMEC.....	181
4.8	PRIMÄRZELLEN IN KO-KULTUR.....	186
4.9	FUNKTIONELLE UNTERSUCHUNG DER ETABLIERTEN KO-KULTUREN	187
4.9.1	<i>Faktoren, die die TJ Barriere beeinflussen</i>	187
4.9.2	<i>Vergleichende Untersuchung der Epithel- und Endothelzellen in Ko-Kultur: CAM-Expression und Freisetzung sekundärer inflammatorischer Mediatoren</i>	191
4.10	METHODENKRITIK UND AUSBLICK	194
5	ZUSAMMENFASSUNG	195
6	LITERATURVERZEICHNIS	197

Abkürzungsverzeichnis

Å	Angström, 0,1 nm
Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin-Converting-Enzyme
AEGM	<u>A</u> irway <u>E</u> pithelial Cell <u>G</u> rowth <u>M</u> edium
ALI	<i>Acute Lung Injury</i>
AP	Alkalische Phosphatase
ARDS	<i>Acute Respiratory Distress Syndrome</i>
ATI	Alveolarepithelzellen vom Typ I
ATII	Alveolarepithelzellen vom Typ II
A549	Zell-Linie, humanes bronchioalveoläres Adenocarcinom der Lunge
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
ECGS	Endothelial Cell Growth Supplement
E-Cadherin	epitheliales Cadherin
CAM	Zelladhäsionsmolekül (Cell Adhesion Molecule)
CD31	<u>C</u> luster <u>D</u> esignation Oberflächenstrukturprotein 31, <i>Synonym: PECAM-1</i>
CD44v6 ⁺	CD44v6 positiv selektionierte Epithelzellen
CLS 1	Collagenase Typ 1
CS-Puffer	“Cytoskeleton Stabilising“-Puffer
d	Tag
DAB	3-3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
DABCO	1,4-diazobicyclo[2.2.2]octan
DHSF	Nutrient Mixture Iscove's modified Dulbecco's Medium & Ham's F12 (1:1, v/v) serumfrei mit Zusätzen
Dil-Ac-LDL	1.1'-dioctadecyl-3,3,3'-tetramethyl-indocarbocyanine perchlorat acetylierte Low Density Lipoproteine
DNase	Desoxyribonuklease
EC	Endothelzelle
ECGF	Endothelial Cell Growth Factor
ECGM-MV	Endothelial Cell Growth Medium Microvascular
ECGS	Endothelial Cell Growth Supplement
ECM	Extrazellulärmatix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
EGTA	Ethylenglycol-bis[β-aminoethyl]-N,N,N',N'-tetraacetoxymethylester
EIA	Enzym-Immuno-Assay
ELISA	Enzym-Linked-Immuno-Sorbent-Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Erys	Erythrozyten
FVIII-rA	FVIII-related Antigen oder von Willebrand Faktor (vWF)
FACS	Fluorescent Activated Cell Sorting
Fc-Fragment	C-terminales Ende der beiden schweren (H-) Ketten der Immunglobuline (durch Papainspaltung erhältlich)
FGF	Fibroblast Growth Factor
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
Fibros	Fibroblasten
FKS	Fötale Kälberserum
FN	Fibronectin
g	Gramm
GA	Glutaraldehyd

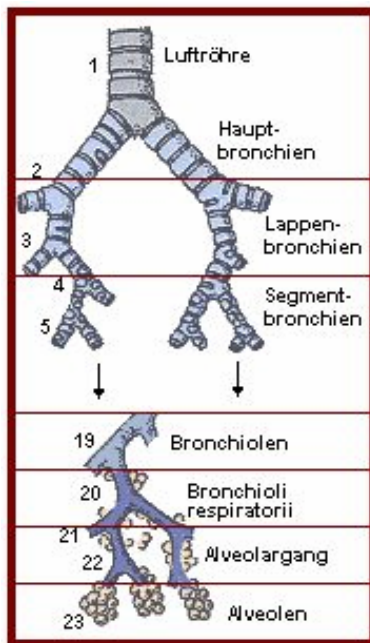
h	Stunde
hATI	humane Alveolarepithelzellen vom Typ I
hATII	humane Alveolarepithelzellen vom Typ II
H & I	Nutrient Mixture Ham's F12 & Iscove's modified Dulbecco's Medium (1:1, v/v)
HE	Hämatoxylin/Eosin-Färbung (Kerne blau, Zytoplasma rot)
Hepes	N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]
HPMEC	Humane Pulmonale Mikrovaskuläre Endothelzellen
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cell
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
IFN- γ	Interferon- γ
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
<i>in situ</i>	an Gewebeschnitten
ITS ⁺	Mediumsupplement mit Insulin, Transferrin, Selensäure und BSA
Kap.	Kapitel
kDa	Kilo-Dalton
Ko-Kulturmedium	MCDB 131, bFGF (2,5 ng/ml), Heparin (10 μ g/ml), 5% FKS
KRP	Kerbs Ringer Puffer
l	Liter
LabTek	8-Kammer-Glasobjektträger zur Zellkultivierung
LB	Lamellar Bodies
LDL	Low Density Lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharid von E.coli
M	Molar
M199	Medium 199
MCDB 131	Kulturmedium entwickelt von Häm <i>et. al.</i> , Formulierung 131 wird zur Kultivierung mikrovaskulärer Endothelzellen verwendet
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
MEC	Mikrovaskuläre Endothelzellen
mg	Milligramm
MG	Molekulargewicht
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MoAk	Monoklonaler Antikörper
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromid
MVB	Multivesikuläre Bodies
MW	Mittelwert
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ M	Mikromolar
NCI	National Cancer Institute
NCI H441	Zell-Linie aus humanem Adenocarcinom der Lunge
NCI H820	Zell-Linie aus humanem Adenocarcinom der Lunge
ng	Nanogramm
n	Anzahl der Einzelbestimmungen
OD	Optische Dichte (Photometereinheit), entspricht Extinktion
o.g.	oben genannt
OPD	o-Phenylen-diamin-dihydrochlorid
P _{app}	Apparenter Permeabilitätskoeffizient (Maß: cm*sec ⁻¹)

PC-Medium	ECGM-MV mit bFGF/Heparin (2,5 ng/10 µg/ml)
P1 (P2 usw.)	erste (zweite usw.) Passage
PBS	Phosphat Buffered Saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
PBSA	PBS mit BSA
PECAM-1	platelet-endothelial cell adhesion molecule-1
PFA	Paraformaldehyd
pg	Pikogramm
PIPES	Piperazin-N,N'-bis[2-Ethansulfonsäure]
RANTES	regulated upon activation normal T-cell expressed and presumably secreted
RNAse	Ribonuklease
RPMI 1640	Kulturmedium entwickelt von Moore <i>et. al.</i> am <u>R</u> oswell <u>P</u> ark <u>M</u> emorial <u>I</u> nstitute, Formulierung 1640
RP/MC	RPMI 1640 + 10% FKS (oberes Well)/ MCDB 131, bFGF (2,5 ng/ml), Heparin (10 µg/ml) + 5% FKS (unteres Well)
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
s	Sekunde
SAGM	<u>S</u> mall <u>A</u> irway Epithelial Cell <u>G</u> rowth <u>M</u> edium
SD	Standardabweichung
sm α-Actin	smooth muscle α-Actin
Stim	Stimulation
SP-A	Surfactantprotein-A
SP-B	Surfactantprotein-B
SP-C	Surfactantprotein-C
SP-D	Surfactantprotein-D
Tab.	Tabelle
TER/TEER	Trans-Bilayer(Epithelial/Endothelial)-Electrical-Resistance
TNF-α	Tumor Necrosis Factor-α
TTF-1	Thyroid Transcription Factor-1
Tween 20	Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat
U	unit (Einheit)
VCAM	Vascular Adhesion Molecule
VEGF	Vascular Endothelial Cell Growth Factor
VE-Cadherin	vascular endotheliales Cadherin oder Cadherin-5
VLA	Very Late Antigen
VPF	vaskulärer Permeabilitätsfaktor (oder VEGF)
vWF	von Willebrand Faktor (oder FVIII-rA)
WP-Körperchen	Weibel-Palade-Körperchen
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
6er Well	Gewebekulturplatte mit 6 Vertiefungen
24er Well	Gewebekulturplatte mit 24 Vertiefungen
96er Well	Gewebekulturplatte mit 96 Vertiefungen, Mikrotiterplatte
T ₂₅	Gewebekulturflasche mit 25 cm ² Oberfläche
Typ I-'like'	Alveolarepithelzellen vom Typ I-ähnlich
ZO-1	Zonula Occludens Protein-1

1 Einleitung

1.1 Die terminale respiratorische Einheit

Die Säugerlunge besitzt zur Luftleitung und zum Gasaustausch ein komplexes System sich verzweigender Strukturen, auch Bronchialbaum genannt. Der menschliche Bronchialbaum zweigt sich von der Luftröhre (Trachea) bis zu den Alveolarbläschen (Alveolen) in 23 Teilungsgenerationen auf (siehe Abb. 1). Aus jeder Teilungsgeneration entstehen zwei neue Zweige, so dass die Anzahl der Bronchien, Bronchiolen und Alveolen exponentiell ansteigt. Nicht alle Strukturen der Lunge dienen dem Gasaustausch zwischen Luftraum und Blut. Man unterscheidet die ausschließlich luftleitenden



(Generation 1-16) von den respiratorischen Abschnitten der Atemwege (Generation 17-23) (Warburton und Bellusci, 2004). Zu den luftleitenden Abschnitten zählen die Nasenhöhle, die Luftröhre (Trachea), die Hauptbronchien, die Lappenbronchien, die Segmentbronchien und die Bronchioli ("kleine Bronchien"), die über ihre Endabschnitte, die Bronchioli terminales (Endbronchiolen), zu den respiratorischen Abschnitten der Atemwege überleiten. Zu den respiratorischen Abschnitten gehören die Bronchioli respiratorii (respiratorischen Bronchiolen) und das Alveolensystem, das aus den Alveolargängen (Ducti alveolares) und den Alveolarsäcken (Sacculi alveolares) besteht. Die kleinsten Aufzweigungen des Bronchialbaums münden in die Alveolen, die eine traubenförmige Aussackung als äußeres Ende des Bronchialbaumes bilden (Abb. 1).

Abb. 1 Verzweigungen des Bronchialbaums

Da die respiratorischen Bronchiolen fließend in Alveolargänge und Alveolarsäcke übergehen werden alle drei Strukturen anatomisch unter dem Begriff 'terminale respiratorische Einheit' zusammengefasst (Abb. 2). Beim Menschen gibt es ungefähr 130.000 terminale respiratorische Einheiten mit jeweils etwa 2000 Alveolen (Haselton und Curry, 1996). Der mittlere Durchmesser einer Alveole beträgt 250 bis 290 μm . Bei einer Anzahl von rund 300 Millionen Alveolen beim Menschen errechnet sich daher eine innere Lungenoberfläche von ca. 140 m^2 (Simionescu, 1980).

Parallel zu den Bronchien verlaufen die Blutgefäße, die sich mit dem Bronchialbaum verzweigen. Insgesamt setzt sich das Lungengewebe aus über 40 verschiedenen Zelltypen zusammen (Jeffery und Reid, 1975). Allein im Bereich der luftleitenden Wege finden sich 12 unterschiedliche Typen von Epithelzellen (Mercer et al., 1994).

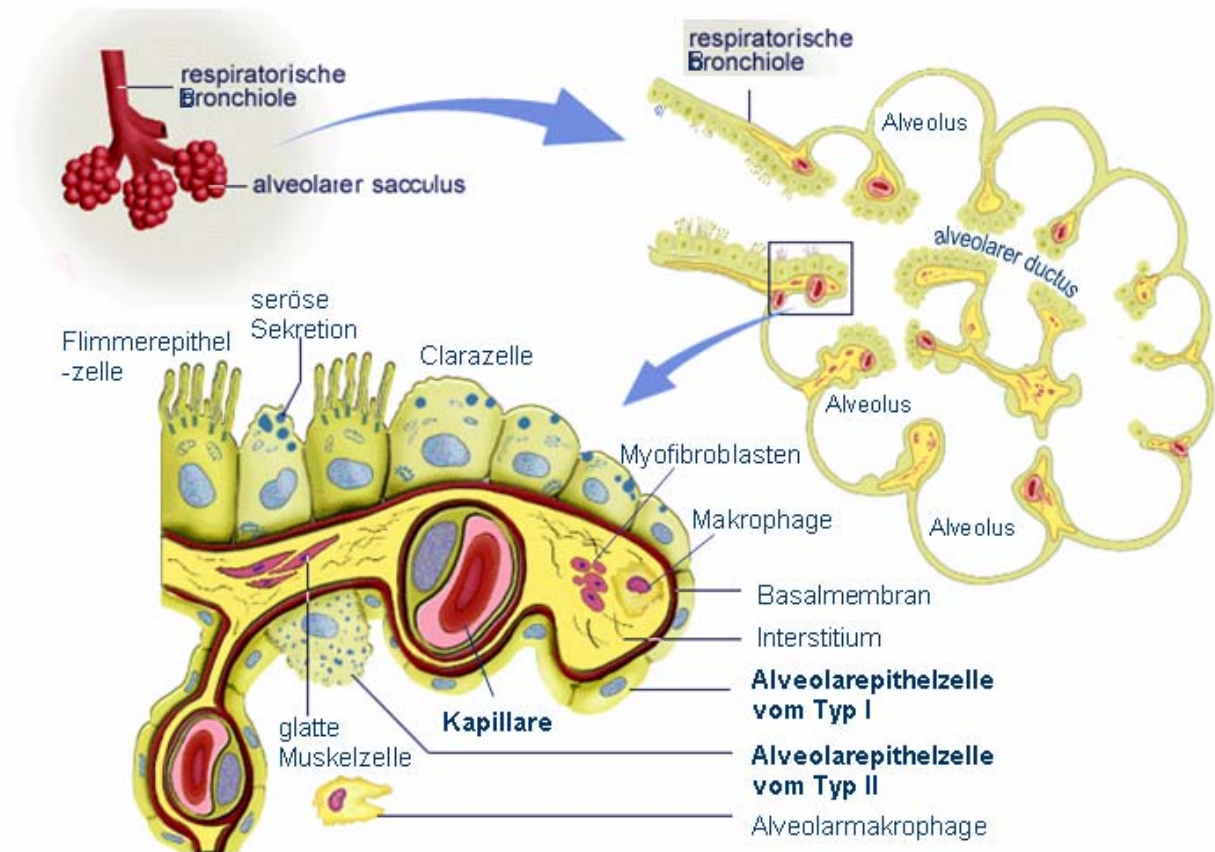


Abb. 2 Die terminale respiratorische Einheit: Respiratorische Bronchiole und Alveoli (verändert nach McGill Molson Medical Informatics Project, Dr. M. McKee Lecture 26. Histology of Respiratory System 3. Respiratory Bronchiole)

Der Übergang vom Epithel der respiratorischen Bronchiolen, mit Flimmerepithelzellen und nicht-zilientragenden Clara-Zellen, zum Epithel der Alveolen ist fließend (Abb. 2). Alveolarepithelzellen (vom Typ I und Typ II) bilden die innere epitheliale Auskleidung der Alveolen. Im alveolären Lumen sind häufig Alveolarmakrophagen mit phagozytierten Partikeln sichtbar. Die Population der Alveolarmakrophagen stammt zum größten Teil von eingewanderten Blutmonozyten und selten von sich teilenden Alveolarmakrophagen (Shellito et al., 1987).

Die Alveolarwand wird von einem Kapillarnetz durchzogen. Zwischen diesen Kapillaren liegt ein schmales Bindegewebsgeflecht (Interstitium), hier sind Makrophagen, glatte Muskelzellen (Perizyten), Myofibroblasten, Mastzellen und gelegentlich Lymphozyten nachweisbar (siehe Abb. 2). Die Bindegewebsmatrix der Septen besteht zu 60% aus kollagenen Fasern, die etwa 20% des Trockengewichts der Lunge ausmachen, zu 35-40% aus elastischen Fasern und zu 1-2% aus Proteoglykanen (Hance und Crystal, 1975). Bei den Kollagenfasern handelt es sich überwiegend um das fibrilläre Kollagen Typ I, weiter kommt das fibrilläre Kollagen Typ III im Bindegewebe der Lunge vor, das netzbildende Kollagen Typ IV ist ein integraler Bestandteil der Basalmembranen (Clark et al., 1983; Amenta et al., 1988; O'Reilly et al., 1991). Die verschiedenen Kollagentypen unterscheiden sich jeweils in der Struktur der drei umeinander gewundenen Molekülketten, die sich zum Tropokollagen zusammenlagern.

1.2 Das Alveolarepithel

Die eigentliche Gasaustauschfläche der Alveolen wird von zwei Zelltypen, den Alveolarepithelzellen (Pneumozyten) vom Typ I (ATI) und Typ II (ATII), gebildet.

1.2.1 Alveolarepithelzellen vom Typ I (ATI Zellen)

Die Alveolarepithelzellen vom Typ I sind flache Zellen, die den größten Teil der Alveolenoberfläche auskleiden. Sie stellen die eigentlichen Deckzellen des Alveolarepithels dar, wobei sie beim Menschen bei einem Anteil von ca. 8% aller Zellen der Inter-alveolarepten ca. 93-95% der Oberflächenauskleidung ausmachen (Crapo et al., 1982). Von ihrem Zellkörper, der vergleichsweise wenige Zellorganellen besitzt und in einer Masche des Kapillarnetzes liegt, überziehen Fortsätze mit einem Durchmesser von teilweise nur 0,1 μm die umgebenden Kapillaren. Die Funktion der ATI Zellen besteht in der Gewährleistung einer möglichst dünnen Trennfläche zwischen Gefäßsystem und Alveolarraum zur Bildung der Blut-Luft-Schranke, die einerseits eine optimale Gasdiffusion zulässt und andererseits durch enge Zell-Zell-Verbindungen (siehe Kap. 1.13) parazellulären Transport (Transport durch die Zellzwischenräume) und Wasserverlust verhindert. In diesen flachen Zellen sind endozytotische Vesikel in großer Anzahl nachweisbar. Als terminal differenzierte Zelle mit fehlender Regenerationsfähigkeit ist die ATI Zelle sehr empfindlich gegenüber zahlreichen exogenen schädigenden Einflüssen (Ward und Nicholas, 1984).

1.2.2 Alveolarepithelzellen vom Typ II (ATII Zellen)

Aufgrund ihrer kuboidalen Morphologie ragen die Alveolarepithelzellen vom Typ II in den Alveolarraum hinein und werden auch „Nischenzellen“ genannt. Typ II Alveolarepithelzellen bedecken nur 7% der alveolären Oberfläche, machen aber 16% aller Zellen der Alveolarepten aus (Crapo et al., 1982). Funktionell handelt es sich bei den ATII Zellen um sezernierende Zellen mit der Fähigkeit zur Proliferation.

ATII Zellen besitzen wichtige Funktionen, die für die Integrität des Alveolarraums unentbehrlich sind. Nach Schädigung oder Zerstörung von Typ I Alveolarepithelzellen können ATII Zellen diese ersetzen, indem sie zu ATI Zellen transdifferenzieren (Adamson und Bowden, 1975; Fehrenbach et al., 1999). Weiterhin synthetisieren und sezernieren ATII Zellen den oberflächenaktiven Surfactant. Dieser Proteinphospholipidfilm (90% Lipide und 10% Surfactant assoziierte Proteine), der als monomolekularer Film das Alveolarlumen auskleidet, setzt die Oberflächenspannung herab und verhindert so den expiratorischen Kollaps der Alveolen (Creuwels et al., 1997; Johansson und Curstedt, 1997). Außerdem nehmen ATII Zellen beim aktiven Transport von Elektrolyten und Flüssigkeit (Dagenais et al., 2001) und bei der Verstoffwechslung einiger xenobiotischer Substanzen (Dimova et al., 2001) eine wichtige Funktion wahr. Darüber hinaus produzieren die ATII Zellen für das Immunsystem wichtige Proteine, die als sekundäre inflammatorische Mediatoren dienen. Hierzu gehören Komplementfaktoren und Zytokine, wie Interleukine (IL-1 β , IL-6 und IL-8), MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1), G-CSF (granulocyte colony stimulating factor), GM-CSF (granulocyte/macrophage-colony stimulating factor), TNF α (tumor necrosis factor α) und TGF β

(transforming growth factor β) (Strunk et al., 1988; Paine et al., 1993; Blau et al., 1994; Crestani et al., 1994; Finkelstein et al., 1997; Koyama et al., 1998; Rosseau et al., 2000). ATII Zellen scheinen eine hohe Zellstoffwechselaktivität zu besitzen, da sie über einen sehr gut entwickelten Golgi-Apparat, große Mitochondrien, große Mengen rauhes endoplasmatisches Retikulum (ER), freie Ribosomen und multivesikuläre/ multilamelläre Körperchen (Lamellar bodies) verfügen.

1.3 Das Kapillarendothel

Lichtmikroskopisch erkennt man die Endothelzellen der Lungenkapillaren an deren Kernregionen, die in das Kapillarlumen ragen, die zytoplasmatische Region der Zellen ist sehr flach und daher schwer zu lokalisieren. Ebenso wie bei den ATI Zellen ist auch in den kapillären Endothelzellen eine große Anzahl endozytotischer Vesikel nachweisbar durch die die endotheliale Oberfläche enorm vergrößert wird (Abb. 3). Das Endothel der Lungenkapillaren ist lückenlos (Simionescu, 1983). Die Zellen bilden enge Zell-Zell-Verbindungen aus (siehe Kap. 1.13.1), die für Serumproteine relativ undurchlässig, für Wasser und kleine wasserlösliche Moleküle jedoch wesentlich durchlässiger sind als die Zell-Zell-Verbindungen der Alveolarepithelzellen (Schneeberger, 1982). Die pulmonalen Endothelzellen sind an wichtigen physiologischen Prozessen beteiligt. Sie spielen zum Beispiel eine zentrale Rolle bei der Regulation des Blutdruckes, bei der Vermittlung von Entzündungsreaktionen und bei der Flüssigkeitshomöostase (Orfanos et al., 1999; Patterson und Lum, 2001; Mehta et al., 2004). Ein für die Regulation des Blutdrucks wichtiges Ektoenzym, das in hoher Anzahl auf der luminalen Oberfläche der Lungenkapillaren vorkommt, ist das *Angiotensin-Converting Enzyme* (ACE) (Tom et al., 2002). Inflammatorische Stimuli induzieren bei pulmonalen mikrovaskulären Endothelzellen die Expression von Selektinen und Adhäsionsmolekülen (siehe Kap. 1.11) und die Freisetzung sekundärer inflammatorischer Mediatoren, wie Komplementfaktoren, MCP-1, IL-8, RANTES (regulated upon activation normal T-cell expressed and presumably secreted), G-CSF und GM-CSF (Beck et al., 1999; Hashimoto et al., 2000; Burg et al., 2002; Numasaki et al., 2004). Weiter haben verschiedene Signalmoleküle wie Sauerstoffradikale, NO, Thrombin, VEGF (vascular endothelial cell growth factor), IL-1 β , TNF- α und IFN- γ (Interferon- γ) Einfluss auf die Permeabilität und somit die Barrierefunktion pulmonaler Endothelzellen (Dudek und Garcia, 2001; Sedgwick et al., 2002; Kaner und Crystal, 2004; Birukova et al., 2005; Irwin et al., 2005).

1.4 Die alveolo-kapilläre Einheit

Die ATI und ATII Zellen der Alveolaroberfläche sind über *Tight Junctions* (siehe Kap. 1.13) miteinander verbunden und bilden so ein kontinuierliches Epithel, das die innere Oberfläche der Alveolen vollständig auskleidet (Weibel et al., 1973; Schneeberger et al., 1978). Sie sezernieren Komponenten der Basalmembran, welche an den Kontaktstellen von Epithel- und Endothelzellen mit Basalmembrankomponenten des Kapillarendothels verschmelzen und eine gemeinsame Basalmembran bilden. Die Basalmembran der Kapillaren umgibt ihrerseits die Alveolen netzartig und wird dabei durch elastische, kollagene und retikuläre Fasern gestützt (Simionescu, 1983). Dadurch entsteht

ein mehr oder weniger enger räumlicher Kontakt der kapillären Endothelzellen mit beiden Typen von Alveolarepithelzellen, den ATI und den ATII Zellen, die alveolo-kapilläre Einheit (Abb. 3).

Charakteristisch für die alveolo-kapilläre Einheit ist der Aufbau einer funktionellen Barriere (siehe Kap. 1.13) und somit die Abgrenzung des Alveolarraums vom vaskulären Lumen. Der Abschnitt der alveolo-kapillären Einheit, bei dem die Diffusionsstrecke der Luft vom Alveolarraum zum vaskulären Innenraum am geringsten ist, wird als Blut-Luft-Schranke bezeichnet. Elektronenmikroskopisch lässt sich zeigen, dass die Blut-Luft-Schranke mindestens aus zwei Zelltypen aufgebaut ist, nämlich den ATI Zellen und den Endothelzellen. An manchen Stellen sind zusätzlich glatte Muskelzellen, Perizyten, Fibroblasten und gelegentlich Plasmazellen vorhanden.

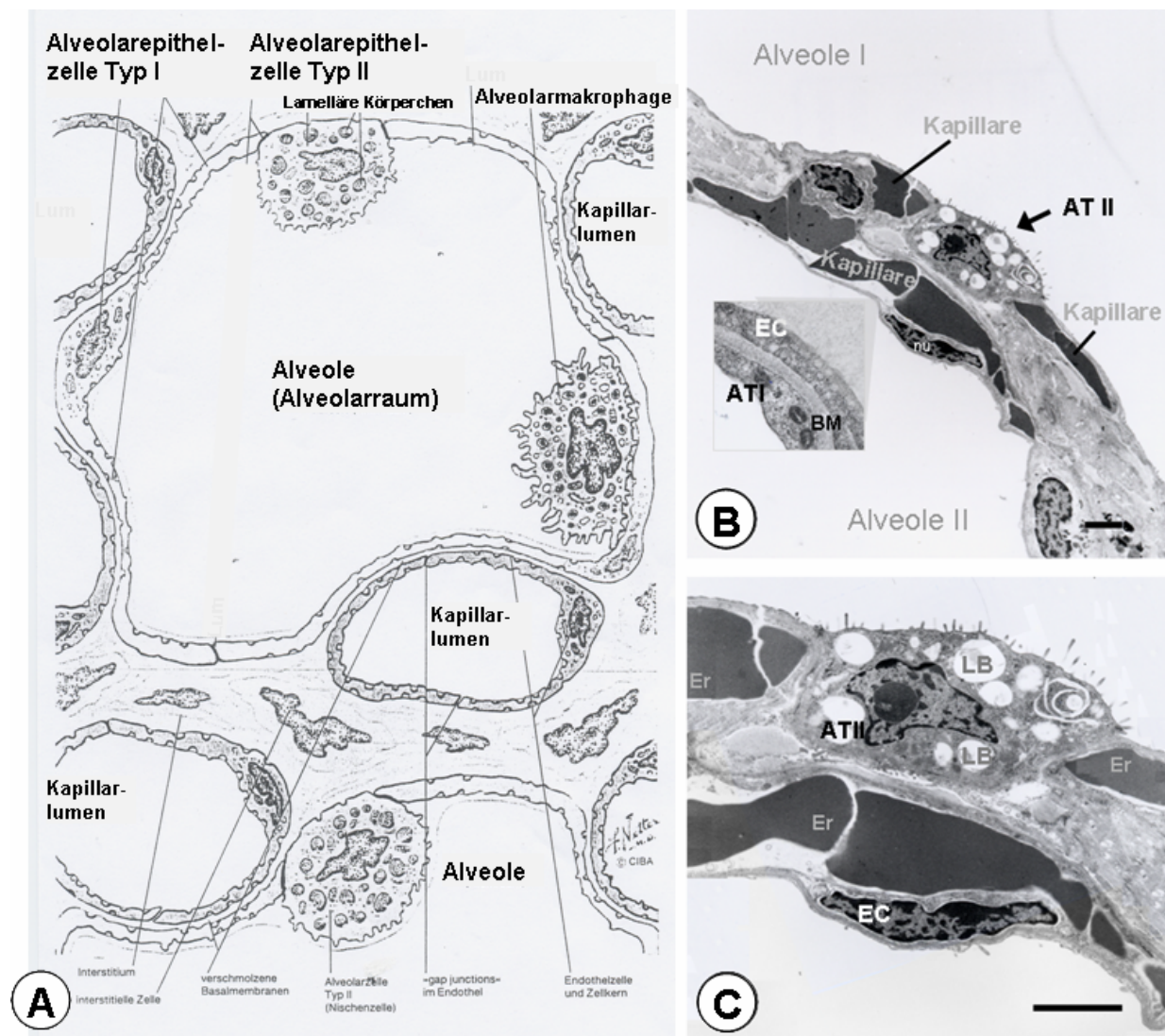


Abb. 3 Schematischer Aufbau der Lungenalveolen und -kapillaren (aus F.H. Netter; Farbatlanten der Medizin; Bd. 4 Atmungsorgane, Thieme Verlag Stuttgart 1994 (A) und Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme von peripheren Lungengewebe mit Alveolen und Kapillaren im Querschnitt (B und Vergrößerung C), ATII=Alveolarepithelzelle vom Typ II, LB=lamelläre Körperchen, EC=Endothelzelle, ATI= Alveolarepithelzelle vom Typ I, BM= Basalmembran, ER=Erythrozyt

Die Zellgrenze zwischen Blut und Luft ist an ihrer dünnsten Stelle nur ca. 0,5 μm dick. Weiterhin gehört zur Blut-Luft-Schranke extrazelluläres Material: nämlich ein oberflächenaktiver Film (Surfactant) zum Alveolarlumen hin sowie die verschmolzenen Basalmembranen zwischen Epithel- und Endothelzellen (Haselton und Curry, 1996). Der Surfactant-Film wird wie bereits beschrieben von ATII Zellen gebildet, die neben den Endothelzellen aktiv am Stoffwechselgeschehen der alveolo-kapillären Einheit beteiligt sind (Fehrenbach, 2001). ATII Zellen sind die physiologisch aktiven Zellen des Alveolarraums, während ATI Zellen eher passive Funktionen wahrnehmen. Neuere Studien belegen, dass auch ATI Zellen über Wasserkanäle eine aktive Funktion bei der Aufrechterhaltung der Flüssigkeitshomöostase im Alveolarraum einnehmen können (Borok et al., 2002; Johnson et al., 2002; Matthay et al., 2002a; Matthay et al., 2002b).

Die alveolo-kapilläre Einheit trennt durch zwei separate Barrieren, die der Alveolarepithelzellen vom Typ I und Typ II und die des pulmonalen kapillären Endothels, das Körperinnere von der Umwelt. Durch eine direkte (intra-alveoläre) oder indirekte (intravaskuläre) Schädigung der alveolo-kapillären Einheit kann es zu Funktionsausfall dieser Alveolarschranke kommen (Bachofen und Weibel, 1977; Matthay, 1994). Dabei werden akute Lungenschäden, unabhängig von der Ursache, meist von einer Entzündungsreaktion (Inflammation) begleitet (siehe Kap. 1.5).

1.5 Inflammatorische Zytokine und Chemokine bei akuter, entzündlicher Lungenerkrankung

Inflammatorische Zytokine spielen als Mediatoren bei entzündlichen Lungenerkrankungen eine zentrale Rolle. In der Lunge ist der Makrophage ein wichtiger Produzent von Zytokinen. IL-1 β und TNF- α werden von stimulierten Alveolarmakrophagen gebildet und stehen als „*early response cytokines*“ am Anfang der inflammatorischen Kaskade. Sie aktivieren neben weiteren Makrophagen auch Fibroblasten, Epithel- und Endothelzellen, die ihrerseits wieder inflammatorische Zytokine produzieren. Außerdem kommt es zur Freisetzung von Chemokinen, die zu der Einwanderung der Leukozyten aus dem Blutstrom an den Entzündungsort führen. Chemokine sind eine Untergruppe der Zytokine. Die zwei Hauptgruppen, CXC-Chemokine und CC-Chemokine, unterscheiden sich durch die Position der beiden ersten Cysteine (C), die entweder durch eine Aminosäure (X) getrennt oder direkt benachbart sind (Baggiolini et al., 1997). Interleukin-8 (IL-8) ist der Hauptvertreter der CXC-Chemokine, die neutrophile Granulozyten aktivieren, während CC-Chemokine hauptsächlich auf Monozyten, Lymphozyten, eosinophile und basophile Granulozyten wirken. Die Chemokine weisen wie auch andere Zytokine teils eine redundante Wirkung auf. Das bedeutet, dass verschiedene Zytokine auf eine Zielzelle die gleiche Wirkung haben. Tierexperimentelle und klinische Studien haben in den letzten Jahren die Wichtigkeit der *early response* Zytokine und der Chemokine bei Patienten mit Sepsis und ARDS (*Acute Respiratory Distress Syndrome*) aufgezeigt. Es konnten signifikant erhöhte TNF- α und IL-1 β -Konzentrationen in der Bronchiallavage-Flüssigkeit (BAL) von Patienten mit ARDS gemessen werden. Dabei traten die höchsten Werte in der Frühphase der Erkrankung auf (Hyers et al., 1991). In der Lungenödemflüssigkeit und Bronchiallavage von Patienten

mit ARDS wurden auch erhöhte Konzentrationen von IL-8 und anderen Chemokinen gefunden, die mit der Zahl an polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten und der Schädigung der Alveolarschranke korrelierten (Miller et al., 1992). Die Rekrutierung von Leukozyten aus dem peripheren Blut über das vaskuläre Endothel ist ein zentrales Ereignis bei der zellulären Antwort des Immunsystems auf Gewebsschädigung oder entzündliche Reize. Dabei werden in der Frühphase vor allem polymorphkernige neutrophile Granulozyten, im weiteren Verlauf Monozyten und Lymphozyten chemotaktisch angelockt. Wichtigster Faktor für die Rekrutierung von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten ist das CXC-Chemokin IL-8. Für die Anlockung von Blutmonozyten sind unter Anderen die CC-Chemokine MCP-1 und RANTES verantwortlich. Eine Expression dieser Chemokine ist für mikrovaskuläre pulmonale Endothelzellen (Brown et al., 1994; Beck et al., 1999; Zachlederova und Jarolim, 2003) sowie für die Zell-Linie A549 (Standiford et al., 1990; Standiford et al., 1991; Rosseau et al., 2000; Krakauer, 2002) *in vitro* nach Stimulation mit *early response* Zytokinen oder Bakterientoxinen beschrieben.

Außer chemotaktischen Faktoren sind Adhäsionsmoleküle auf Endothelzellen und Leukozyten für eine Anlockung in den Alveolarraum notwendig. Die *early response* Zytokine regulieren die Expression dieser Adhäsionsmoleküle im und um den Entzündungsherd. Freigesetztes IL-1 β und TNF- α führen beispielsweise zur Hochregulierung von Selektinen (z.B. E-Selektin) und Adhäsionsmolekülen (z.B. ICAM-1 und VCAM-1) auf dem Gefäßendothel (siehe Kap. 1.11). Die Balance zwischen pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen bzw. Zytokininhibitoren ist ausschlaggebend für den Verlauf einer entzündlichen Reaktion. So inhibieren beispielsweise die anti-inflammatorischen Zytokine IL-10 und IL-13 die Produktion von TNF- α , IL-1 β und IL-6 durch Alveolarmakrophagen nach deren Stimulation mit LPS (Berkman et al., 1996; Thomassen et al., 1996; Lo et al., 1998). Dabei tragen zusätzliche Faktoren wie Lipidmediatoren, Komplementprodukte, Sauerstoffmetabolite, NO, Proteasen und Antiproteasen zu dem Verhältnis zwischen pro- und anti-inflammatorischer Aktivität bei. Histopathologisch werden sowohl die akuten Lungenschädigung (ALI, *acute lung injury*), die Pneumonie und das oft lebensbedrohliche ARDS durch diffuse alveoläre Schäden mit einer interstitiellen und alveolären Infiltration von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen gekennzeichnet. Im Falle des ARDS führt die Aktivierung der häufig über die Mikrozirkulation eingewanderten Granulozyten zur Sekretion von Proteasen und Sauerstoffmetaboliten. Unter Anderem wird dadurch eine Schädigung des Kapillarendothels wie auch des Alveolarepithels und damit zum Funktionsausfall der Alveolarschranke hervorgerufen (Bachofen und Weibel, 1977; Matthay, 1994). Die Zerstörung der alveolo-kapillären Barriere führt zur Ausprägung eines interstitiellen Ödems und zum Ablösen des Alveolarepithels („*alveolar flooding*“) mit einer abnormen Ansammlung proteinreicher Flüssigkeiten im Alveolarlumen (Permeabilitätslungenödem) (Shimabukuro et al., 2003). Das Alveolarepithel wird dabei durch die Proliferation der Alveolarepithelzellen vom Typ II und deren anschließende Differenzierung zum Typ I Zell Phänotyp (Transdifferenzierung) ersetzt, um die Funktion der normalen Alveolarschranke aufrecht zu erhalten.

Im Gegensatz zur Pneumonie, bei der oft eine vollständige Abheilung beobachtet werden kann, kommt es nach einem ARDS häufig zum fibrotischen Umbau der Lunge mit entsprechendem Lungenfunktionsausfall. Die Ursachen dieser unterschiedlichen Verläufe sind noch weitgehend unklar. Es wird angenommen, dass Zytokine nicht nur bei der Entzündungsreaktion mit einer daraus resultierenden Zerstörung des Gewebes, sondern auch bei den anschließenden Reparationsvorgängen eine entscheidende Rolle spielen (Shimabukuro et al., 2003).

1.6 Zellkulturmodelle der alveolo-kapillären Einheit

Die komplexe Struktur der Lunge erschwert funktionelle Untersuchungen an der alveolo-kapillären Einheit *in vivo*. Der Einsatz von Zellkulturen stellt für die Aufklärung von Wirkmechanismen auf zellulärer und molekularer Ebene eine geeignete Alternative dar. Primäre Mono-Kulturen von Alveolarepithelzellen der Ratte sind in der toxikologischen und pharmakologischen Wirkstoffprüfung bereits häufig verwendete *in vitro* Modelle (Simon et al., 1991; Matsukawa et al., 1997; Dodoo et al., 2000; Dimova et al., 2001; Campbell et al., 2003; Kastelova et al., 2003). ATII Zellen lassen sich in größerer Menge nach enzymatischem Aufschluss aus perfundierten Rattenlungen gewinnen. Hier ist der Aufbau einer dichten epithelialen Barriere (siehe Kap. 1.13) eine wichtige Voraussetzung für das Vorliegen eines differenzierten epithelialen Layers. Modelle, die primäre humane Alveolarepithelzellen einsetzen, sind wegen der geringen Verfügbarkeit des Zellmaterials seltener, finden aber zunehmend Interesse, da immer mehr Speziesunterschiede zwischen Nagerzellen und humanen Zellen entdeckt werden (Nikula et al., 1997; Dormans et al., 1999; Houser et al., 2004).

Wegen der Spendervarianzen bei primär isolierten Zellen und der geringen Verfügbarkeit von gesundem humanem Primärmaterial wird nach Zell-Linien gesucht, die die Eigenschaften der Primärzellen möglichst exakt nachahmen. Bisher sind nur humane Zell-Linien mit Eigenschaften von Typ II Alveolarepithelzellen bekannt (siehe Kap. 1.12). Die bisher beschriebenen Zell-Linien mit ATII Eigenschaften unterscheiden sich jedoch von den humanen Primärzellen, da sie keine Transdifferenzierung zu ATI-ähnlichen Zellen (siehe Kap. 1.7) zeigen.

ATII Zellen stellen wichtige Zielzellen für pathophysiologische Fragestellungen dar, da sie als Vorläufer der ATI Zellen, als Verwerter xenobiotischer Substanzen, als Produzent des Surfactants und weiterer inflammatorisch wirksamer Mediatoren fungieren (Dimova et al., 2001; Kastelova et al., 2003). Eine Schädigung von ATII Zellen hat demnach größere Folgen auf die Integrität des Alveolarraums als eine Schädigung von ATI Zellen, die durch ATII Zellen regeneriert werden können.

Die ATII Eigenschaften zeigende humane Zell-Linie A549 wurde bereits von drei Arbeitsgruppen in Ko-Kultur mit Endothelzellen als Modell für eine alveolo-kapilläre Einheit verwendet. An der Ko-Kultur von A549 mit primären humanen Umbilicalvenen-Endothelzellen (HUVEC) (Carolan et al., 1997; Casale und Carolan, 1999) bzw. mit primären humanen pulmonalen mikrovaskulären Endothelzellen (HMVEC-L) (Hu et al., 2005) wurde die Leukozytentransmigration über die alveolo-kapilläre Barriere untersucht. Die Ko-Kultur von A549 mit einer immortalisierten mikrovaskulären

Zell-Linie aus humanem Lungengewebe (HULEC) diente zum Studium eines mikrobiellen Infektionsweges (Birkness et al., 1999). Bei diesen Modellen wurden die Zellen auf gegenüber liegenden Seiten einer permeablen Filtermembran ko-kultiviert. Die Zell-Layer auf beiden Seiten der Filtermembran wurden zwar morphologisch beschrieben, der Aufbau einer dichten Barriere wurde aber nicht genauer untersucht.

Für primär isolierte Zellen ist bisher erst ein Ko-Kultur Modell beschrieben, das auf einer Ko-Kultur von ATII Zellen der Ratte mit bovinen mikrovaskulären Endothelzellen beruht (Gueven et al., 1996). Das Modell wurde eingehend morphologisch charakterisiert. Unter Verwendung eines serumfreien Mediums und bei Kultivierung der Epithelzellen an der Flüssigkeits/Luft-Grenze wurde ein differenzierter Monolayer von Alveolarepithelzellen und von mikrovaskulären Endothelzellen auf gegenüber liegenden Seiten der Filtermembran erreicht. Eine genauere Untersuchung der Barriereigenschaften der Bilayer-Ko-Kultur fand nicht statt.

1.7 Transdifferenzierung von Typ II zu Typ I Alveolarepithelzellen *in vitro*

Die Isolierung von ATI Zellen ist verglichen mit der Isolierung von ATII Zellen (siehe Material und Methoden, Kap. 2.5) wesentlich schwieriger, da die Typ I Zellen sehr feine zytoplasmatische Ausläufer besitzen und ihre interzellulären Verbindungen stark ausgeprägt sind. Außerdem wurde eine Proliferation nur bei ATII Zellen und nicht bei ATI Zellen beobachtet. Die fehlende Möglichkeit der ATI Zellen eine Mitose durchzuführen wurde dadurch erklärt, dass sie wegen ihrer langen zytoplasmatischen Fortsätze theoretisch nicht in der Lage sind sich abzukugeln und zu teilen (Weibel, 1974). Die Isolierung von ATI Zellen ist bisher nur bei Ratten gelungen (Dobbs et al., 1998; Borok et al., 2002).

Die Eigenschaften von ATI Zellen wurden daher meist in Studien ermittelt, in denen primär isolierte ATII Zellen *in vitro* auf Gewebekulturschalen oder permeablen Filtermembranen zu ATI-ähnlichen (ATI-`like`) Zellen transdifferenzierten (Lubman und Crandall, 1992; Borok et al., 1998; Chen et al., 2004). Werden ATII Zellen der Ratte auf Gewebekulturschalen oder permeablen Filtermembranen in serumhaltigem Medium kultiviert, so flachen die Zellen ab, verlieren die morphologischen Eigenschaften von differenzierten ATII Zellen und stellen die Synthese und Sekretion von Surfactant ein (Dobbs et al., 1985). Diese metabolischen Veränderungen beginnen innerhalb der ersten 24 h der Kultivierung und schreiten über mehrere Tage in Kultur fort. Da die Veränderungen der ATII Zellen innerhalb weniger Tage in Kultur stattfinden, werden die Zellen meist direkt nach der Isolation (in P0) auf permeablen Filtermembranen kultiviert. Diese *in vitro* beobachteten Veränderungen der ATII Zellen ähneln dem Verhalten adulter Alveolarepithelzellen vom Typ II nach einer Schädigung des Lungengewebes *in vivo* (Fehrenbach et al., 1999). Daher wird der Vorgang analog der Transformation von Typ II zu Typ I Zellen *in vivo* Transdifferenzierung genannt und die abgeflachten Zellen als ATI-ähnliche (ATI-`like`) Zellen bezeichnet (Lubman und Crandall, 1992; Borok et al., 1998; Chen et al., 2004). Ein Parameter der Transdifferenzierung zu ATI-ähnlichen Zellen ist der Aufbau einer dichten epithelialen Barriere, die durch den Aufbau eines

stabilen transepithelialen elektrischen Widerstands (TER-Wert, siehe Kap. 1.13.3) von $>1000 \Omega \times \text{cm}^2$ bis $>2000 \Omega \times \text{cm}^2$ gekennzeichnet ist (Cheek et al., 1989; Borok et al., 1994; Borok et al., 1995; Matsukawa et al., 1997; Elbert et al., 1999; Roum et al., 2001).

Wie ATII Zellen der Ratte transdifferenzieren auch die menschlichen ATII Zellen *in vitro* auf permeablen Filtermembranen innerhalb von 8 bis 10 Tagen zu ATI-ähnlichen Zellen (Diglio und Kikkawa, 1977; Elbert et al., 1999; Fuchs et al., 2003).

1.8 Marker für Alveolarepithelzellen vom Typ I

Gegen humane Alveolarepithelzellen vom Typ I existieren bisher wenig zelltypspezifische Antikörper. Spezifische Marker für diesen Zelltyp, wie T1 α (Williams et al., 1996) und RTI40 (Gutierrez et al., 1998), wurden für ATI Zellen der Ratte, HTI56 (Dobbs et al., 1999; Newman et al., 2000) zum Nachweis humaner ATI Zellen beschrieben. Aquaporin-5, ein Wasserkanalprotein, wird häufig als Marker für ATI Zellen eingesetzt. *In vitro* wurde eine Zunahme der Aquaporin-5 Expression bei der Transdifferenzierung von ATII Zellen zu ATI-ähnlichen Zellen der Ratte gezeigt (Borok et al., 1998). Die Expression von Aquaporin-5 war in der Lunge jedoch nicht auf ATI Zellen beschränkt, so wurde *in situ* an Mäuselungen Aquaporin-5 auch in ATII Zellen sowie trachealen und bronchialen Epithelzellen nachgewiesen (Krane et al., 2001). ATI-spezifische Membraneinstülpungen, die Caveolae (siehe Kap. 1.11), dienen einigen Arbeitsgruppen als Nachweis für die Transdifferenzierung von ATII Zellen zu ATI-ähnlichen Zellen *in vitro* (Campbell et al., 1999; Fuchs et al., 2003), da sich ultrastrukturell bei ATII Zellen *in situ* keine Caveolae nachweisen ließen (Newman et al., 1999). Außerdem wurde bei der Transdifferenzierung *in situ* in terminal differenzierten ATI-ähnlichen Zellen eine hohe Expression des Hauptstrukturproteins der Caveolae, Caveolin-1, gezeigt, während Alveolarepithelzellen vom Typ II nur eine geringe Expression aufwiesen (Kasper et al., 1998). Bei der Transdifferenzierung von ATII zu ATI-ähnlichen Zellen *in vitro* konnte ebenfalls eine Zunahme der Expression von Caveolin-1 im humanen wie im Rattenmodell gezeigt werden (Campbell et al., 1999; Fuchs et al., 2003). Ein Mitglied der Immunglobulingenfamilie, RAGE (receptor for advanced glycation end-products) ist selektiv an der basalen Membran von humanen ATI Zellen lokalisiert und wird *in situ* weder von ATII Zellen noch von Kapillarendothelzellen exprimiert (Fehrenbach et al., 1998; Kasper et al., 2004). Dieser *in situ* spezifische Marker für Alveolarepithelzellen vom Typ I wurde jedoch für den Nachweis von humanen ATI-ähnlichen Zellen *in vitro* bisher nicht beschrieben.

1.9 Charakteristische Eigenschaften von Alveolarepithelzellen vom Typ II

Für Alveolarepithelzellen vom Typ II sind zahlreiche zelltypspezifische Eigenschaften bekannt. Im Folgenden werden die zur Charakterisierung der isolierten humanen ATII Zellen untersuchten Eigenschaften aufgeführt.

Lamellar bodies

Lamellar Bodies sind in großer Anzahl in Alveolarepithelzellen vom Typ II zu finden. Sie sind rundliche bis länglich ovale Zellorganellen, in deren Inneren sich zahlreiche elektronendichte Lamellen finden. Elektronenmikroskopisch haben sie im Anschnitt einen durchschnittlichen Durchmesser von 0,2-1,5 μm und neben den stark osmiophilen Lamellen eine wenig elektronendichte Matrix, die oft artifiziell auseinander gerissen erscheint. Sie werden von einer Doppelmembran umgeben und enthalten reichlich Lipoproteine in ihren Lamellen. Diese Lamellen sind nur wenige nm dick und damit dünner als die Doppelmembran. Lamellar Bodies dienen in ATII Zellen als Speicher für Komponenten des Surfactantsystems (Dobbs et al., 1997). Sie liefern den Lipoproteinanteil für den Surfactant und entleeren sich ins Alveolarlumen.

Surfactantproteine

Surfactant (Kunstwort aus *Surface active agent*; oberflächenaktive Substanz, auch Anti-Atelektasfaktor) ist ein komplexes Gemisch, das zu ca. 90 % aus Lipiden und zu ca. 10 % aus Proteinen besteht. Der Hauptbestandteil der Lipidfraktion, Dipalmitylphosphatidylcholin, Dipalmityl-Lecithin oder Hydrolecithin, ist für die reduzierte Oberflächenspannung der Alveolen verantwortlich. Ein wichtiger Effekt der Herabsetzung der Oberflächenspannung durch den Surfactant ist die Verringerung des transepithelialen Druckgradienten im Interalveolareseptum, der ohne Surfactant ca. 12 mm Hg betragen würde (mit Surfactant ca. 3 mm Hg), so dass dadurch die Ausbildung eines Lungenödems verhindert wird. Die Proteinfraction, die aus den Surfactantproteinen SP-A, -B, -C, -D besteht, hat unter anderem die Aufgabe, den Surfactantstoffwechsel zu steuern. SP-A und SP-D sind in ihrer Funktion als Kollektine immunologisch wirksam und wehren inhalierte Pathogene ab (Crouch, 1998). Indem sie an deren Oberfläche binden und somit als Opsonine fungieren, induzieren sie eine Eliminierung diverser Pathogene durch Makrophagen. Weiterhin können SP-A und SP-D einer inflammatorischen Reaktion im Alveolarraum entgegenwirken. So haben beide Apoproteine eine hohe Affinität sowohl zur Lipid-A-Komponente als auch zu einigen Polysaccharid-Domänen von bakteriellen Endotoxinen und können über deren Bindung die proinflammatorischen Endotoxineffekte neutralisieren (Rosseau et al., 2000). Zusätzlich wird angenommen, dass SP-A und SP-D eine antioxidative Wirkung haben (White et al., 2001).

Die Alveolarepithelzellen vom Typ II sind die einzigen Zellen, die alle 4 Surfactantproteine exprimieren. Außer ATII Zellen sind die Clarazellen der terminalen und respiratorischen Bronchiolen in der Lage SP-A, SP-B und SP-D zu bilden (Kalina et al., 1992; Voorhout et al., 1992; Madsen et al., 2000; Takezawa et al., 2002). Da in Clarazellen der Ratte kein SP-C nachgewiesen werden konnte

(Kalina et al., 1992), weist eine Expression von SP-C an isolierten Epithelzellen der Lunge auf das Vorliegen von ATII Zellen hin.

Thyroid Transcription Factor-1 (TTF-1)

Das Kernprotein TTF-1 (thyroid transcription factor-1) ist außer in Lungenepithelzellen bei Zellen der sich entwickelnden Neurohypophyse und der Schilddrüse nachweisbar (Lazzaro et al., 1991). Bei der Embryonalentwicklung der Ratte wurde TTF-1 ab der 23. Woche in der Lunge hauptsächlich in ATII Zellen nachgewiesen (Ikeda et al., 1995), während Alveolarepithelzellen vom Typ I keine Expression von TTF-1 zeigen (Zhou et al., 1996). Außer von ATII Zellen wird TTF-1 von Clarazellen der respiratorischen Bronchiolen exprimiert. Durch Bindung an deren Promotoren aktiviert der Transkriptionsfaktor TTF-1 die Gene für die Surfactant Proteine A (Bruno et al., 1995), SP-B (Bohinski et al., 1994; Stahlman et al., 1996), SP-C (Kelly et al., 1996) und das Clarazell-Protein CC-10 (oder CCSP, Clara cell secretory protein) (Zhang et al., 1997).

Zytokeratine

Alveolarepithelzellen vom Typ I und II bilden für Epithelzellen typische Intermediärfilamente, die Zytokeratine. In Alveolarepithelzellen vom Typ II lassen sich *in vitro* Zytokeratin 7, Zytokeratin 8, Zytokeratin 18 und Zytokeratin 19 nachweisen. Zytokeratin 19 ist ein mit der Differenzierung von Typ II Alveolarepithelzellen assoziiertes Zytokeratin (Paine et al., 1988; Woodcock-Mitchell et al., 1990). Die vermehrte Ausbildung von Desmosomen korreliert mit einer erhöhten mRNA-Expression von Zytokeratin 19. Gleichzeitig kommt es bei einer Reduktion der Desmosomenzahl durch Ca^{2+} -Entzug zu einer Reduktion der mRNA-Expression von Zytokeratin 19 (Paine et al., 1995). *In situ* wurde eine starke Immunreaktivität für Zytokeratin 8 und Zytokeratin 18 und eine schwache Immunreaktivität für Zytokeratin 7 und Zytokeratin 19 bei Typ II Zellen der Ratte beschrieben (Kasper et al., 1993).

Alkalische Phosphatase

Das Enzym Alkalische Phosphatase (AP) ist in der apikalen Plasmamembran der Alveolarepithelzellen vom Typ II lokalisiert. Seine Funktion ist bei ATII Zellen nicht weiter untersucht. Die Aktivität der AP wird als Differenzierungsmarker für Alveolarepithelzellen vom Typ II verwandt (Edelson et al., 1988). Histologisch zeigen außer den ATII Zellen Clarazellen und Fibroblasten im Bereich der terminalen respiratorischen Einheit endogene AP-Aktivität. Die Aktivität der AP kann *in vitro* als Marker für eine Transdifferenzierung der ATII Zellen eingesetzt werden, da die AP-Aktivität bei primär isolierten Alveolarepithelzellen vom Typ II schon nach wenigen Tagen in Kultur deutlich nachlässt (Kovacikova et al., 1999; Reynolds et al., 1999).

CD44v6

CD44 beschreibt eine polymorphe Familie von Glykoproteinen der Zelloberfläche mit verschiedenen Funktionen, z. B. bei der Zelladhäsion und Migration und der Regulation von Zell-Matrix Interaktionen. Der Hauptligand für CD44 ist das Glucosaminoglykan Hyaluronsäure (Bajorath et al., 1998; Banerji et al., 1998). Neben Standardform von CD44 (CD44s), die bei vielen Zelltypen vorkommt, sind die variablen Isoformen (Splicevarianten CD44v) meist auf Epithelzellen beschränkt. In fötalem Lungengewebe wird die Isoform CD44v6 von allen Epithelzellen exprimiert und ist mit der Bereitstellung von Wachstumsfaktoren, die für Morphogenese und Migration eine Rolle spielen, assoziiert (Fasano et al., 1997). Demgegenüber markiert anti-CD44v6 in der adulten, nicht neoplastischen Lunge spezifisch die Alveolarepithelzellen vom Typ II (Kasper et al., 1996; Fehrenbach et al., 1999; Fehrenbach et al., 2002) und die Basalzellen des Bronchialepithels (Wimmel et al., 2001), die beide als Stammzellen des jeweiligen Gewebetyps gelten. Im adulten Lungengewebe liegt die Funktion von CD44v6 in einer Verankerung der Zellen mit der extrazellulären Matrix und scheint für die Migration der Stammzellen während Reparaturvorgängen notwendig zu sein (Fasano et al., 1997).

Eine Expression von CD44v6 wird *in vivo* als Marker für Alveolarepithelzellen vom Typ II eingesetzt (Kasper et al., 1995a). So konnte eine durch den Wachstumsfaktor KGF (keratinocyte growth factor) induzierte Proliferation von ATII Zellen mittels positiver Markierung von CD44v6 *in vivo* nachgewiesen werden (Fehrenbach et al., 1999). Desweiteren wird CD44v6 in der Tumordiagnostik verwandt. Die CD44v6-Expression bleibt in bronchioloalveolären Karzinomen erhalten (Kasper et al., 1995a; Fasano et al., 1997; Wimmel et al., 2001), was auf einen histogenetischen Zusammenhang zwischen der Stammzelle und dem Tumor schließen lässt.

1.10 Aufrechterhaltung eines differenzierten Phänotyps *in vitro*

Durch Komponenten der extrazellulären Matrix, lösliche Faktoren (wie Wachstumsfaktoren), mechanische Effekte oder durch Kultivierung an der Flüssigkeits-Luft-Grenze (liquid-air) kann der Phänotyp von Alveolarepithelzellen in Kultur beeinflusst werden (Gutierrez et al., 1998; Sugahara et al., 1998; Berrios et al., 2001; Mason et al., 2002). Durch eine geeignete Wahl der Kulturbedingungen kann somit der morphologische, biochemische und molekulare Phänotyp der Alveolarepithelzellen beibehalten oder auch wiedergewonnen werden (Rannels et al., 1989; Danto et al., 1995; Xu et al., 1998; Isakson et al., 2001; Sanchez-Esteban et al., 2001). Unter anderem beeinflusst foetales Kälberserum (FKS) die Differenzierung der Alveolarepithelzellen in Kultur. Der Phänotyp der Alveolarepithelzellen vom Typ II scheint in Kultur besser erhalten zu bleiben, wenn kein FKS vorhanden ist. So wurde die Struktur der Lamellar Bodies und die Synthese des Lipoproteinanteil für den Surfactant-Film bei ATII Zellen der Ratte länger beibehalten, wenn im Kulturmedium FKS durch Rattenserum ersetzt wurde (Cott et al., 1987; Borok et al., 1995). Die Differenzierung von ATII Zellen der Ratte blieb darüber hinaus *in vitro* besser erhalten, wenn die isolierten Zellen ganz ohne

Serumzusatz kultiviert wurden (Kawada et al., 1990; Paine et al., 1990). Durch weitere Faktoren, wie z.B. Hormone oder second messenger kann die Differenzierung von ATII Zellen *in vitro* gesteuert werden. So konnte zum Beispiel der ATII-Phänotyp bei fötalen humanen Alveolarepithelzellen mit Hilfe von Dexamethason und cAMP aufrechterhalten werden (Gonzales et al., 2002). Ähnliches wurde für fötale ATII Zellen der Ratte beschrieben (Bates et al., 2002).

1.11 Charakteristische Eigenschaften des Kapillarendothels

Elektronenmikroskopisch finden sich in den Endothelzellen der Lungenkapillaren perinukleär Mitochondrien, granuläres Endoplasmatisches Retikulum (ER), multiveskuläre Granula, Mikrotubuli, Mikrofilamente und Weibel-Palade-Granula (siehe Abb. 4). Die schlanken Zellausläufer besitzen kaum Organellen und sind an manchen Stellen nur etwa 0,1 µm dick. Durch Untersuchungen zur Beteiligung des Kapillarendothels der Lunge an der metabolischen Umsetzung zirkulierender vasoaktiver Substanzen entdeckte man mikroendozytotische Bläschen, durch die die Endothelfläche enorm vergrößert wird (Ryan et al., 1985). Diese als Caveolae bezeichneten Strukturen kommen in großer Anzahl sowohl luminal als auch basal vor. Die Caveolae der kapillären Endothelzellen der Lunge sind teilweise mit einem Diaphragma, bestehend aus einer einfachen Membran, verschlossen (siehe Abb. 4).

Caveolae

Caveolae besitzen eine charakteristische omega-förmige Struktur mit einem Durchmesser von 50-100 nm und sind in vielen Zelltypen zu finden. Sie repräsentieren eine Form von Lipid-Mikrodomänen („lipid rafts“) innerhalb der Plasmamembran, die mit Cholesterol und Glykolipiden angereichert ist. Caveolae stehen im Zusammenhang mit zellulären Transportprozessen, z. B. der Transzytose und dem Cholesterol-Transport. Caveolae enthalten die Proteine Caveolin-1, -2 und -3 als strukturbildende Elemente. Wie im Kapitel 1.8 bereits erwähnt ist das Hauptstrukturprotein der Caveolae Caveolin-1. Es wird in vielen Zelltypen exprimiert, besonders häufig in Fibroblasten, Adipozyten, Endothel- und Epithelzellen (Lavie et al., 1998; Newman et al., 1999; Drab et al., 2001; Razani et al., 2002).

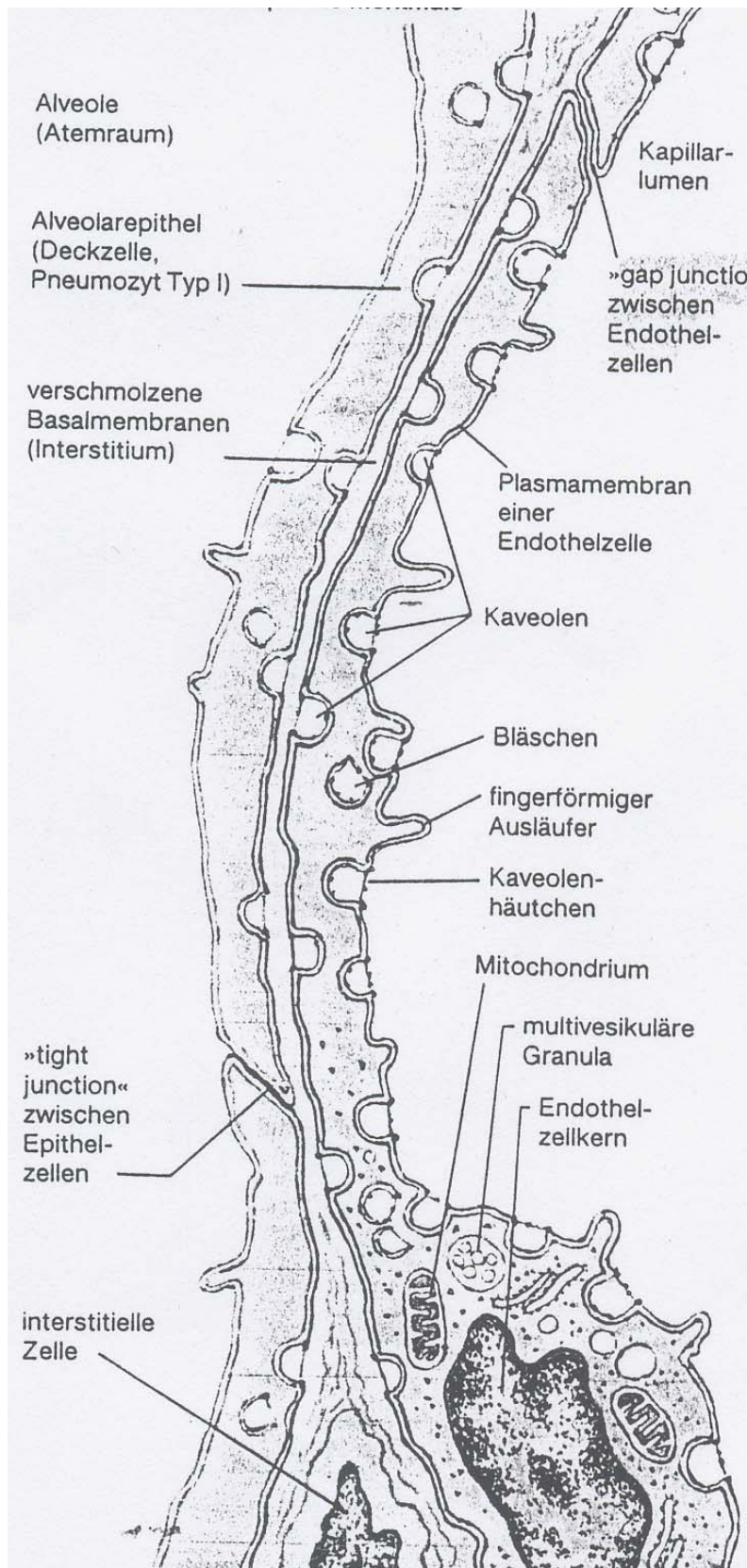


Abb. 4 Schematischer Aufbau des kapillären Endothels der Blut-Luft-Schranke (aus F.H. Netter; 1994)

Selektine

Selektine, eine Gruppe von bisher drei transmembranen Glykoproteinen, sind entscheidend für die initiale Bindung von Leukozyten an Endothelzellen im Rahmen entzündlicher Reaktionen. P-Selektin (CD 62P, GMP-140 oder PADGEM) wurde zuerst in zytoplasmatischen Vesikeln (α -Granula) der Thrombozyten entdeckt, bei Endothelzellen wird es in Weibel-Palade-Körperchen gespeichert. Nach Induktion durch Thrombin oder Histamin wird P-Selektin innerhalb weniger Minuten auf der Zytoplasmamembran der Endothelzellen exprimiert (Bonfanti et al., 1989). Das endothelspezifische Selektin E-Selektin (CD 62E, ELAM-1 oder LECAM-1) wird nicht konstitutiv exprimiert. Durch Endotoxin oder Zytokine (IL-1 β , TNF- α) stimuliert wird seine Transkription induziert und das Protein erreicht nach 4-6 Stunden seine maximale Expression an der Zelloberfläche von kultivierten HUVEC (Bevilaqua et al., 1989). Nach 24-48 Stunden stellt sich der Basalwert wieder ein. P-Selektin und E-Selektin vermitteln die Interaktion von Endothelzellen mit polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) und Monozyten. Das dritte bekannte Selektin, L-Selektin, wird von den meisten Leukozyten exprimiert. Epithelzellen produzieren keine Selektine.

Eine selektin-vermittelte Adhäsion von Leukozyten an Endothel führt nicht zu einer festen Bindung und Transmigration, dazu ist eine weitere Interaktion mit Mitgliedern von Zell-Adhäsionsmolekülen der Immunglobulin-Gen-Superfamilie notwendig (Zimmerman et al., 1992).

ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1)

ICAM-1 ist ein Membranglykoprotein von 80 bis 115 kDa, das konstitutiv sowohl von Endothelzellen als auch von verschiedenen anderen Typen von Zellen, wie Fibroblasten, Epithelzellen, Lymphozyten und Monozyten gebildet wird. Die Expression von ICAM-1 kann *in vivo* sowie *in vitro* bei Endothelzellen durch Zytokine wie IL-1 β und TNF- α stimuliert werden. Nach 16-24 Stunden ist die Expression maximal und bleibt für mindestens 72 Stunden erhöht (Beekhuizen & van Furth, 1993). ICAM-1 nimmt an verschiedenen Zell-Zell Interaktionen teil und ist im Besonderen für eine feste Bindung von Leukozyten an Endothelzellen über seine Interaktion mit den Integrinen LFA-1 (CD11a/CD18) und Mac-1 (CD11b/CD18) auf den zirkulierenden Leukozyten verantwortlich (Shimizu et al., 1992; Dustin & Springer, 1988). ICAM-1 kann, als Ergebnis einer proteolytischen Abspaltung von der Zelloberfläche, in einer biologisch aktiven Form in Serum nachgewiesen werden (sICAM-1).

PECAM-1 (Platelet Endothelial Adhesion Molecule-1)

PECAM-1 (CD 31) wird konstitutiv auf der Zelloberfläche von Endothelzellen ($\approx 10^6$ Moleküle pro Zelle), Thrombozyten (Newman et al., 1990), Monozyten, Granulozyten (Stockinger et al., 1990) und einer Subpopulation von Lymphozyten (Tanaka et al., 1992) exprimiert. PECAM-1 spielt bei der Adhäsion von Thrombozyten bei Entzündungsreaktionen und bei der Wundheilung eine Rolle (Newman et al., 1990). Weiterhin ist es an der Leukozyten-Adhäsion und -Transmigration durch die

Endothelzellschicht beteiligt (Carlos und Harlan, 1994). PECAM-1 ist außerdem bei interendothelialen Zell-Zell-Interaktionen von Bedeutung (Corada et al., 1999; Ilan et al., 1999). Bei Endothelzellen in Kultur ist PECAM-1 verstärkt an den Zellgrenzen konfluenter Monolayer lokalisiert (Albelda et al., 1990; Dejana et al., 1995). Bei noch nicht konfluenten Zellkulturen oder an der Leitfront migrierender Zellen wird PECAM-1 diffus auf der Zelloberfläche exprimiert (Schimmenti et al., 1992). Eine PECAM-1-Expression wird von allen vaskulären Endothelzellen gezeigt (Kuzu et al., 1992) und ist daher als panendothelialer Marker für vaskuläres Endothel geeignet.

VCAM-1 (Vascular Adhesion Molecule-1)

VCAM-1, ein 90 bis 110 kDa Membranglykoprotein, wird von Endothelzellen konstitutiv nicht oder nur minimal gebildet, seine Expression kann aber durch IL-1 β , IL-4, TNF- α und Interferon- γ (IFN- γ) induziert werden (Shimizu et al., 1991; Saito et al., 1996). VCAM-1 dient als ein Ligand für VLA-4 ($\alpha_4\beta_1$ -Integrin) auf Lymphozyten, Monozyten und eosinophilen Granulozyten und $\alpha_4\beta_7$ -Integrin auf aktivierten peripheren T-Zellen (Ruegg et al., 1992; Zimmerman et al., 1992). Diese Eigenschaften deuten darauf hin, dass VCAM-1 bei entzündlichen Reaktionen eine Rolle bei der Adhäsion von Monozyten an Endothelzellen spielt (Beekhuizen et al., 1992). VCAM-1 kann, als Ergebnis einer proteolytischen Abspaltung von der Zelloberfläche, in einer biologisch aktiven, d.h. VLA-4 bindenden, Form in Serum nachgewiesen werden (sVCAM-1) (Gearing et al., 1992).

1.12 Zell-Linien

Kulturen humaner Primärzellen sind aufwendig und schwer zu standardisieren, da das humane Gewebe selten verfügbar ist und meist krankheitsbedingt entfernt wurde. Wegen der begrenzten Zahl und der begrenzten Vermehrungsfähigkeit der isolierten Zellen in Kultur müssen verschiedene Spender untersucht werden, deren Markerprofile individuell variieren. Aus diesen Gründen wird zur Untersuchung definierter biologischer Parameter nach Zell-Linien gesucht, die in entscheidenden Eigenschaften den Primärzellen entsprechen. Da Tumorzellen nie alle Charakteristika der Primärzellen gleichen Ursprungs besitzen, ist es von großer Bedeutung, dass die für die individuelle Fragestellung relevanten Eigenschaften der ursprünglichen Zelle erhalten sind. Zell-Linien, die die Eigenschaften von mikrovaskulären Endothelzellen bzw. Alveolarepithelzellen aufwiesen und damit für ein Ko-Kulturmodell einer distalen respiratorischen Einheit geeignet schienen, sind im Folgenden aufgeführt.

1.12.1 Endotheliale Zell-Linien

In einer vorangegangenen Forschungsarbeit wurden phänotypische Merkmale verschiedenster endothelialer Zell-Linien untersucht. Zwei Zell-Linien: ISO-HAS-1 und ST1-6.R, zeigten viele mit primär isolierten Endothelzellen übereinstimmende phänotypische Merkmale (Unger et al., 2002).

ISO-HAS-1 wurde in unserem Labor aus der dermalen Angiosarkom-Zell-Linie ISO-HAS (Masuzawa et al., 1999) kloniert (Krump-Konvalinkova et al., 2003). ST1-6.R Zellen sind immortalisierte humane pulmonale mikrovaskuläre Endothelzellen (HPMEC). Sie wurden mit zwei Plasmiden kotransfiziert, von denen das eine für Telomerase (hTERT), das andere für das Simian Virus 40 (SV40) Large T-Antigen kodiert. ST1-6.R Zellen zeigen viele phänotypische Merkmale von Endothelzellen, wie die Expression von PECAM-1 sowie die stimulationsabhängige Induktion von ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin (Unger et al., 2002). Desweiteren besitzt diese Zell-Linie ein hohes angiogenes Potential, welches durch die Bildung kapillarähnlicher Strukturen auf Matrigel gezeigt werden konnte (Krump-Konvalinkova et al., 2001).

1.12.2 Epitheliale Zell-Linien

Die Zell-Linie A549, eine aus einem humanen Bronchialkarzinom vom bronchioalveolären Typ klonierte Zell-Linie, zeigt die typischen Lamellar Bodies der Alveolarepithelzellen vom Typ II und die Produktion von Surfactant (Lieber et al., 1976). A549 Zellen produzieren eine Reihe wichtiger entzündungsrelevanter Faktoren: Als Antwort auf eine Stimulation mit Asbest-Fasern, TNF- α und IL-1 β werden MCP-1 und IL-8 exprimiert (Standiford et al., 1990; Standiford et al., 1991; Rosenthal et al., 1994).

Die humane Adenokarzinom Zell-Linie NCI H441 (papillärer Typ) hat sowohl Eigenschaften von Alveolarepithelzellen vom Typ II als auch von Clarazellen (nicht-zilientragende Epithelzellen der respiratorischen Bronchiolen) und produziert die Surfactantproteine SP-A und SP-B (Gazdar et al., 1990; Pryhuber et al., 1998; Chess et al., 2000). NCI H441 Zellen besitzen einen im Vergleich zu A549 Zellen verlangsamten Zellzyklus und sind daher die geeignetere Zell-Linie für Proliferationsstudien (Chess et al., 2000).

Die Zell-Linie NCI H820, ebenfalls eine Adenokarzinom Zell-Linie vom papillären Typ, wurde von Gazdar und Mitarbeitern (Gazdar et al., 1990) beschrieben. Sie konnten bei NCI H820 die Expression der Surfactant-Proteine, SP-A, SP-B und SP-C nachweisen, wobei die mRNA von SP-A und SP-B konstitutiv, die von SP-C erst nach Induktion mit Dexamethason nachweisbar war. Auch ultrastrukturell ist die Zell-Linie NCI H820 dem Phänotyp der Alveolarepithelzellen vom Typ II ähnlich (Gazdar et al., 1990). In der Literatur wird NCI H820 wenig zitiert, da sie als Zell-Linie in Suspensionskultur wächst, was Studien an diesem Zelltyp erschwert.

1.13 Aufbau einer intakten Barriere in vitro

Für das Modell einer distalen respiratorischen Einheit war die Differenzierung der beteiligten Zellen in Ko-Kultur wichtige Voraussetzung. Wie *in vivo* sollten die beiden Zelltypen, Alveolarepithelzellen und mikrovaskuläre Endothelzellen, in direktem Kontakt stehen und neben wichtigen zelltypspezifischen Markern einen einschichtigen Zell-Layer (Monolayer) ausbilden. Ein Kriterium für die Differenzierung war die Ausbildung einer möglichst intakter Zellschicht von epithelialen sowie endothelialen Zellen mit ausgeprägten Zell-Zell-Kontakten, so dass eine intakte zelluläre Barriere resultiert.

1.13.1 Interzelluläre Verbindungen (Junktionen)

Epithel- und Endothelzellen besitzen spezifische Molekülkomplexe, welche für die homophilen interzellulären Verbindungen verantwortlich sind. Man unterteilt dabei drei Typen von Verbindungen: (1) undurchlässige Verbindungen, die *Tight Junctions (TJ)*; (2) Haftverbindungen, wie *Adherens Junctions (AJ)*, Fokalkontakte und Desmosomen, sowie (3) kommunizierende Verbindungen, die *Gap Junctions*.

(1) *Tight Junctions* (auch als *Zonula Occludentes* bezeichnet) sind interzelluläre leistenförmige Kontaktstellen, bei denen die Membranen der miteinander verbundenen Zellen in auffallend engem Kontakt stehen. Innerhalb der *Tight Junctions* kommt es zur direkten Interaktion von membran-integrierten Proteinen (Ward et al., 2000). Occludinmoleküle füllen im Bereich des eigentlichen Kontaktes die äußere Schicht der Zellmembranen aus, reichen aber nur ein Stück weit über die innere elektronendichte Schicht der Zellmembranen ins Zellinnere hinein, wo sie an die Proteine *Zonula Occludentes Protein-1 (ZO-1)*, *Zonula Occludentes Protein-2 (ZO-2)* und *Zonula Occludentes Protein-3 (ZO-3)* binden (Cordenonsi et al., 1999), die ihrerseits wiederum mit Aktinfilamente des Zytoskeletts interagieren. Die an die Innenseite der Zellmembran gebundenen Proteinaggregate (Plaques) sind nur wenige Nanometer dick und enthalten neben den eben genannten ZO-1, ZO-2 und ZO-3 Plaqueproteinen noch ein weiteres, das Cingulin. Es wird vermutet, dass die strukturelle Organisation der *Tight Junctions* von ZO-1 und ZO-2 gesteuert wird (Ward et al., 2000). Die Bildung von *Tight Junctions* wird über G-Proteine, Kalziumionen und Proteinkinase C reguliert (Stuart und Nigam, 1995; Lacaz-Vieira, 1997; Hopkins et al., 2000; Karczewski und Groot, 2000). Die eigentlichen Kontaktstellen der *Tight Junctions* sind so stabil und fest, dass sie für Makromoleküle ($>10 \text{ \AA}$), praktisch undurchlässig sind.

(2) Bei den *Adherens Junctions* handelt es sich um interzelluläre Verbindungen, die mit dem Aktin-Zytoskelett der Zelle interagieren. Sie entstehen über eine Ca^{2+} -abhängige Assoziation spezifischer Transmembranproteine, den Cadherinen, und anschließender Kopplung an den intrazellulären α -, β -, γ -Catenin-Komplex. Die Catenine α -, β -, γ -Catenin (Plakoglobin) sind an der Bindung an den kortikalen Aktinring beteiligt. Die Cadherine bilden eine große Familie Ca^{2+} -abhängiger Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle. Cadherine angrenzender Zellen binden aneinander und sind

an der homotypischen Zell-Zell-Adhäsion (Adhäsion von gleichartigen Zellen aneinander) beteiligt (Duguay et al., 2003; Foty und Steinberg, 2004).

Verschiedene Zelltypen zeigen ein spezifisches Expressionsmuster von Cadherinen. Das VE (vascular endothelial)-Cadherin oder Cadherin-5 ist auf allen Endothelzelltypen exprimiert (Dejana et al., 2000). E (epithelial)-Cadherin ist der wichtigste Mediator der interzellulären Adhäsion von Epithelzellen (Gumbiner, 1996). Es tritt sehr früh während der Embryonalentwicklung auf und korreliert mit verschiedenen morphogenetischen Vorgängen, bei denen Zellaggregation und -disaggregation eine Rolle spielen (Gumbiner, 1996). Verminderte Expression und Mutation von E-Cadherin korrelieren mit der Invasivität und Metastasierung von Tumoren des Menschen (Boyer et al., 1993). Das Transmembranprotein E-Cadherin einer Zellmembran verbindet sich über Ca^{2+} -Ionen mit dem E-Cadherin der Nachbarzelle. Im Bereich einer *Adherens Junction* ist der Interzellularspalt zwischen den beteiligten Epithelzellen 10 nm bis 20 nm weit. Obwohl E-Cadherin auf der gesamten lateralen Plasmamembran lokalisiert ist, findet man es konzentriert in den *Adherens Junctions*. Trotzdem scheinen nicht nur *Adherens Junctions* sondern auch *Tight Junctions* und Desmosomen E-Cadherin zu benötigen, um sich strukturell und funktionell zu organisieren (Ando-Akatsuka et al., 1999). E-Cadherin spielt außerdem eine wichtige Rolle bei der zellulären Differenzierung eines epithelialen Phänotyps, die Ausbildung einer Zellpolarität und einer dichten epithelialen Zellschicht eingeschlossen (Gumbiner, 2000).

Ebenfalls über Aktinverbindungen organisiert sind Verbindungen von der Zelle zur extrazellulären Matrix (ECM), sogenannte Fokalkontakte (focal adhesions). An der Bildung von Desmosomen sind Intermediärfilamente beteiligt (Runswick et al., 2001).

(3) Mittels *Gap Junctions* stehen Nachbarzellen über Poren miteinander in Kontakt. Diese porenbildenden Strukturen werden als Connexone bezeichnet und setzen sich aus hexagonal angeordneten Untereinheiten, den Connexinen, zusammen. Die benachbarten Connexone zweier miteinander kommunizierender Zellen bilden eine zytoplasmatische Brücke (Abraham et al., 1999).

1.13.2 Regulation der Barriere (Integrität und Dysfunktion)

Sowohl *Tight* (Schneeberger et al., 1978), *Adherens* als auch *Gap* (Lee et al., 1997) *Junctions* verbinden ATI und ATII Zellen mit- und untereinander und ermöglichen so eine Barrierefunktion sowie eine interzelluläre Kommunikation. *Tight Junctions* stellen eine dynamisch regulierte Diffusionsbarriere dar, die auf verschiedene physiologische, pharmakologische und pathologische Bedingungen reagieren kann (Anderson und Van Itallie, 1995). Bei Epithelzellen besitzen *Tight Junctions* zwei Hauptfunktionen. Sie bauen eine Transportbarriere auf, indem sie die zelluläre Schicht für Ionen und gelöste Substanzen mehr oder weniger durchlässig machen („gate“-Funktion), und verhindern eine Durchmischung von apikalen und basolateralen Membrankomponenten („fence“-Funktion), wie Lipiden und Proteinen (Braga, 2002). *Tight Junctions* liegen an der apikalen Kontaktzone benachbarter Epithelzellen mit der Aufgabe die Polarität der Zellen aufzubauen und zu erhalten. Um sich strukturell und funktionell zu organisieren, interagieren *Tight Junctions* mit

Adherens Junctions (Ando-Akatsuka et al., 1999) und bilden den apikalen junctionalen Komplex (AJC = *apical junctional complex*), der meist von einem Desmosom begleitet wird.

Im Gegensatz zu Epithelzellen zeigen Endothelzellen keinen klaren strukturellen Aufbau von *Adherens Junctions* und apikalen *Tight Junctions*. Man findet beide junctionalen Strukturen entlang der lateralen Kontaktzonen von benachbarten Endothelzellen (Schnittler, 1998; Vestweber, 2000). Das Endothel größerer Gefäße zeigt gut ausgeprägte *Tight Junctions* und ist daher relativ undurchlässig für Wasser und darin gelöste Stoffe. Kapilläres Endothel besitzt locker organisierte *Tight Junctions*, von denen man annimmt, dass sie eine höhere Permeabilität für Wasser aufweisen (Schneeberger, 1982; Haselton und Curry, 1996). Bei einer intakten pulmonalen endothelialen Barriere ist Aktin als kortikaler Aktin-Ring innerhalb der Zellen nachweisbar (Dudek und Garcia, 2001). Über diesen kortikalen Aktinring interagieren die zytoplasmatischen Bestandteile der Zell-Zell-Verbindungen. Für pulmonale Endothelzellen sind folgende, mit dem Aktin-Zytoskelett assoziierte Zell-Zell-Verbindungen beschrieben: (1) *Tight Junctions* (2) *Adherens Junctions* und (3) PECAM-1 assoziierte Verbindungen (Abb. 5).

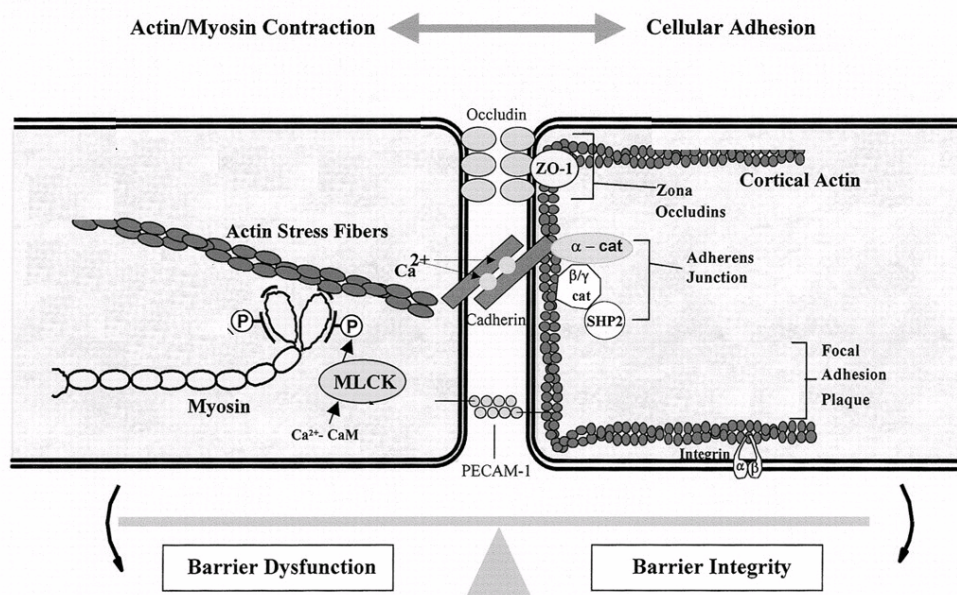


Abb. 5 Aufbau von Zell-Zell-Verbindungen bei pulmonalen Endothelzellen

Barriere-Integrität:

- A. *Tight Junction* (*Zona Occludens*) mit dem Transmembranprotein *Occludin* assoziiert mit Aktin über *ZO-1*
- B. *Adherens Junction* mit dem Ca^{2+} abhängigen Transmembranprotein *Cadherin-5* gekoppelt an kortikales Aktin über einen Catenin-Komplex
- C. Fokalkontakt (*Focal Adhesion Plaques*) mit ECM-bindenden *Integrin*-Transmembranproteinen
- D. *PECAM-1*-assoziierte Verbindung

Störung der Barrierefunktion (Barriere-Dysfunktion):

Phosphorylierung von Myosin und Ausbildung von Aktin-Stress-Fasern [verändert nach Dudek und Garcia, 2001]

Bei Störung der endothelialen Barrierefunktion kommt es zu einer Phosphorylierung von Myosin, das wiederum mit dem kortikalen Aktin interagiert und eine Bildung von Aktin-Stress-Fasern und eine damit einhergehende Lockerung der Zell-Zell-Verbindungen induziert (Abb. 5). Die Phosphorylierung von Myosin über die Myosin-Leichtketten-Kinase (Myosin Light Chain Kinase, MLCK) stellt sowohl für Endothelzellen als auch für Epithelzellen nur einen von mehreren Mechanismen der Regulation von *Tight Junctions* dar. Sie scheint aber, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, ein gemeinsamer Zwischenschritt bei vielen physiologischen und pathophysiologischen Signalwegen zu sein, die mit einer veränderten parazellulären Permeabilität einhergehen (Turner et al., 1997; Turner et al., 1999; Nusrat et al., 2000; Turner, 2000).

Da *Tight Junctions* hoch dynamische Strukturen darstellen, die bei Erkrankungen und als Antwort auf funktionellen Stress rasche Veränderungen zeigen (Godfrey, 1997), ist ihr Aufbau *in vitro* in hohem Maße von der Differenzierung der Zellen abhängig. Faktoren wie Hormone und Zell-Zell- sowie Zell-Matrix-Interaktionen beeinflussen die zelluläre Differenzierung. Glukokortikoide, die für eine normale Entwicklung der Lungen benötigt werden, spielen besonders bei der Differenzierung und Reifung von Zellen des Epithels eine Rolle (Oshika et al., 1998). Durch das Glukokortikoid Dexamethason konnte der differenzierte Phänotyp von humanen fötalen Alveolarepithelzellen vom Typ II *in vitro* erhalten werden (Gonzales et al., 2002). Ein weiterer Effekt von Dexamethason, die Festigung der epithelialen Barriere, wird für Mamma-Epithelzellen beschrieben (Zettl et al., 1992). Dexamethason induziert in diesen Zellen verschiedene Signalkaskaden (Singer et al., 1994; Wong et al., 1999; Woo et al., 1999; Woo et al., 2000; Guan et al., 2002; Rubenstein et al., 2003).

Ein stimulierender Effekt von Glukokortikoiden auf die Ausbildung von *Tight Junctions* wurde auch für Endothelzellen (EC) gezeigt. So erhöhte Hydrocortison *in vitro* die Barrierefunktion boviner Hirnendothelzellen (Hoheisel et al., 1998) und retinaler mikrovasculärer EC (Antonetti et al., 2002) und Dexamethason steigerte die Ausbildung von *Tight Junctions* bei humanen Endothelzellen des Schlemm-Kanals des Auges (Underwood et al., 1999). Außerdem haben cAMP und Agenzien, die die Konzentration von intrazellulären Ca^{2+} -Ionen steigern, einen stabilisierenden Effekt auf die Ausbildung von *Tight Junctions* (Gumbiner et al., 1988; Nilsson et al., 1996; Lacaz-Vieira, 1997; Cerejido et al., 2000; Al-Bazzaz und Gailey, 2001; Dagenais et al., 2001; Dye et al., 2001).

1.13.3 Nachweismethoden des Aufbaus einer zellulären Barriere

Nachweis der Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten

Epithelzellen grenzen das Körperinnere vom funktionellen Außenraum ab, ähnlich bilden die Endothelzellen eine Grenzfläche für die zirkulierenden Blutzellen zum Interstitium. Differenzieren Epithel- und Endothelzellen in Kultur, so bilden sie enge interzelluläre Zell-Kontakte aus. Bei kuboidalen Epithelzellen lässt sich ein hoch organisierter apikaler junktionaler Komplex (AJC), der aus einem apikalen *Tight Junction*-Band und benachbart lokalisierten *Adherens Junctions* besteht und meist von einem Desmosom begleitet wird (Ando-Akatsuka et al., 1999), elektronenmikroskopisch nachweisen. Bei Endothelzellen findet man elektronenmikroskopisch weniger komplex organisierte Zell-Zell-Verbindungen mit *Adherens Junctions* und *Tight Junctions* entlang der lateralen Kontaktzonen (Vestweber, 2000). Ergänzend zum morphologischen Nachweis zellulärer Kontakte lassen sich deren Struktur-Proteine mittels Immunzytochemie oder Immunfluoreszenz darstellen. Bei einer intakten epithelialen (Fanning et al., 1998) sowie endothelialen (Dudek und Garcia, 2001) Barriere ist Aktin als kortikaler Aktin-Ring innerhalb der Zellen nachweisbar.

Messung des elektrischen Widerstands

Die Messung des elektrischen Widerstands durch einen epithelialen bzw. endothelialen Monolayer oder einen epithelial/endothelialen Bilayer (transepithelial/transbilayer electrical resistance = TER) ist umgekehrt proportional zu den über den Layer transportierten Ionen. Der TER-Wert stellt somit ein Maß für den parazellulären und transzellulären Ionenfluss dar. Dabei werden parazellulär wesentlich mehr Ionen transportiert als transzellulär. Da der Netto-Ionentransport hauptsächlich vom parazellulären Ionenfluss abhängt, ist der TER ein Indikator für die Ausbildung von dichten Zell-Zell-Verbindungen. Endothelzellen besitzen wie Epithelzellen *Tight Junctions*, die jedoch nicht so hoch organisiert sind wie die der Epithelzellen (Schnittler, 1998; Vestweber, 2000). Daher werden bei Endothelzellen wesentlich geringere TER-Werte gemessen als bei Epithelzellen. Da die Komplexität des *Tight Junction*-Netzwerks innerhalb der verschiedenen Epithelzelltypen stark variiert, wurde angenommen, dass es einen direkten Zusammenhang zwischen dem gemessenen TER und der Komplexität der *Tight Junctions* gibt (Schneeberger und Lynch, 2004). Tatsächlich scheint ein logarithmischer Zusammenhang zwischen der Anzahl der *Tight Junction*-Strukturen und dem gemessenen TER-Wert zu bestehen (Claude, 1978). Je höher der TER-Wert, desto höher ist die Anzahl der *Tight Junction*-Strukturen.

Bestimmung des Permeabilitätskoeffizienten für den parazellulären Transport

Zur weiteren Charakterisierung der Barrierefunktion kann neben der Messung des TER-Werts die Aufnahme von Stoffen über den zellulären Layer untersucht werden. Hier wird ebenfalls zwischen einem parazellulären und einem transzellulären Transport unterschieden.

Tight Junctions dienen als Hindernis gegen die Diffusion von Substanzen zwischen der apikalen und basolateralen Plasmamembran-Domäne. Je nach Dichte der Zell-Zell-Verbindungen des Zell-Layers erfolgt ein unterschiedlicher parazellulärer Stoffaustausch. *Tight Junctions* sind für Makromoleküle in der Regel undurchlässig, können aber von kleinen hydrophilen Substanzen, wie Wasser, Methanol, Ethanol, Glycerin, Harnstoff und Natrium-Fluoreszein (7-10 Å), passiert werden. Über die Messung des parazellulären Transports von Natrium-Fluoreszein pro Zeiteinheit durch einen Zell-Layer bzw. einen Bilayer von Epithel- und Endothelzellen in Ko-Kultur lässt sich ein Permeabilitätskoeffizient errechnen (siehe Material und Methoden, Kap. 2.14.3). Dieser gibt eine Geschwindigkeit an, mit der der untersuchte Stoff (Natrium-Fluoreszein) über die Zellschicht transportiert wurde. Je größer der Permeabilitätskoeffizient (cm/sec) desto permeabler ist die zelluläre Barriere. Mit zunehmender Molekülgröße verringern sich die Permeabilitätskoeffizienten (Matsukawa et al., 1997).

Proliferation/Differenzierung (Ki 67 als Proliferationsmarker)

Da der Aufbau einer intakten zellulären Barriere mit dem Rückgang der proliferativen Aktivität einhergeht, kann die Differenzierung von Zellen zu einem dichten kontaktinhibierten Zell-Layer auch über eine verringerte proliferative Aktivität nachgewiesen werden. Ki 67 ist ein kernständiges Nicht-Histon Protein, das sehr eng mit der Proliferation von somatischen Zellen verknüpft (Endl und Gerdes, 2000) und außer in der G₀-Phase in allen Phasen des Zellzyklus nachweisbar ist (Gerdes et al., 1984). Die Expression beginnt bei vorher ruhenden Zellen in der späten G₁-Phase, steigt in der S-Phase an und erreicht das Maximum in der G₂- und M-Phase (Sasaki et al., 1987). Nach der Mitose fällt sie sofort ab. Sich kontinuierlich teilende Zellen zeigen während der gesamten G₁-Phase eine positive Reaktion für Ki 67. Während des größten Teils der Interphase wird Ki 67 *in vitro* hauptsächlich in den Nukleoli proliferierender Zellen insbesondere in deren Peripherie vorgefunden (Takagi et al., 1999). Während der Mitose bei Mensch und Maus findet man eine Markierung mit anti-Ki 67 als Netzwerk an der Oberfläche kondensierter Chromosomen (Verheijen et al., 1989; Takagi et al., 1999). Sehr bald nach dem Austritt aus der Mitose, in der frühen G₁-Phase, ist Ki 67 über viele kleine nukleäre Foci verteilt, die später in der G₁-Phase in und um den neu gebildeten Nukleolus und die Heterochromatinbezirke des Kerns kondensieren (Kreitz et al., 2000). Die Tatsache, dass Ki 67 ausschließlich während des aktiven Zellzyklus exprimiert wird, macht die Markierung dieses Proteins durch spezifische Antikörper zu einem wichtigen und mittlerweile sehr verbreiteten Instrument zur Beurteilung der Zellproliferation (Scholzen und Gerdes, 2000). Ki 67 spielt eine Rolle bei der höheren Ordnung der Chromatinstruktur (Scholzen et al., 2002).

Zielsetzung

Ziel der Promotionsarbeit war es, ein reproduzierbares Testsystem für *in vitro* Studien an der alveolo-kapillären Einheit aufzubauen. Besonders im Hinblick auf die Etablierung intakter epithelialer und endothelialer Monolayer und der Beibehaltung wichtiger phänotypischer Eigenschaften der Endothel- sowie Epithelzellen sollte ein „*in vivo* nahes“ Modell für weitere pathogenetische, toxikologische oder pharmakologische Studien etabliert werden.

Das Ko-Kulturmodell sollte geeignet sein, grundlegende Aspekte der molekularen Wechselwirkungen im Bereich der Alveolen aufzuklären, z.B.:

- (1) wie Endothelzellen das Wachstum und die Differenzierung von Epithelzellen beeinflussen und umgekehrt.
- (2) wie Zellen in Ko-Kultur durch physiologische Stimuli, z.B. durch Zytokine, aktiviert werden
- (3) welche Effekte diese Stimuli auf die Integrität der alveolo-kapillären Barriere sowie die Freisetzung sekundärer epithelialer/endothelialer Zytokine haben.

Zu diesem Zweck sollen folgende Voraussetzungen geschaffen werden:

- Entwicklung optimaler Kulturbedingungen für Epithelzell- und Endothelzell-Linien in Mono-Kultur im Hinblick auf Proliferation und Differenzierung
- Charakterisierung der Epithelzell- und Endothelzell-Linien in Mono-Kultur bei optimalen Kulturbedingungen
 - Nachweis zelltypspezifischer Eigenschaften
- Untersuchung der immunmodulatorischen Eigenschaften der Zellen in Mono-Kultur im Vergleich mit primär isolierten Zellen
 - Expression von Zelladhäsionsmolekülen
 - Freisetzung von sekundären Zytokinen
- Ko-Kultivierung pulmonaler Epithelzellen mit mikrovaskulären Endothelzellen:
 - Etablierung einer funktionellen Barriere
 - morphologische/immunzytochemische Charakterisierung von Epithel- und Endothelzellen in Ko-Kultur
- Untersuchung der immunmodulatorischen Eigenschaften des Ko-Kulturmodells
 - Expression von Zelladhäsionsmolekülen
 - Freisetzung von sekundären Zytokinen

Insgesamt soll diese Arbeit eine optimierte Methode zur Ko-Kultivierung epithelialer und endothelialer Zell-Linien als Modell für eine funktionelle alveolo-kapilläre Einheit erarbeiten.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Geräte

2.1.1 Chemikalien

Acrylamid (30%)/Bisacrylamid (0,8%)	Roth, Karlsruhe 3029-1
Agar 100 Resin	Plano, Wetzlar R 1043
Avidin/Biotin (AB)-Blocking-Kit	Vector, Grünberg SP-2001
Albumin, bovin (0,005% Fettsäuren) [BSA]	Sigma, Taufkirchen A 7638
Albumin, bovin 35 %ige Lösung, steril	Sigma, Taufkirchen A 7409
Alkalische Phosphatase Färbekit	Sigma, Taufkirchen 86-C
Blockierungsreagenz	Roche, Mannheim 1112589
Bis-(2-hydroxyethyl)imino-tris(hydroxymethyl)methan Ciprobay 200	Sigma, Taufkirchen B7954 Bayer, Leverkusen 82420402 PZN-7802062
DNase	Roche, Mannheim 1284932
D(+)-Glukose-Monohydrat	Merck, Darmstadt 4074
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck, Darmstadt 6580
EGTA (Ethylenglycol-bis(β-aminoethyl)-N,N,N',N'- tetraacetoxymethylester)	Sigma, Taufkirchen E 4378
Eosin G	Merck, Darmstadt 15935
Essigsäure 99-100%	Baker, Griesheim 6152
Ethanol	Riedel de Haen, Seelze 34923
Fibronektin, human	Sigma, Taufkirchen F 3648
Formaldehyd 37%	Merck, Darmstadt 40031000
Fungizone-Lösung	Gibco, Karlsruhe 15290-026
Gelatine 2%ige Lösung, Typ B aus Rinderhaut	Sigma, Taufkirchen G 1393
Giemsa-Färbelösung	Merck, Darmstadt 9204
Glyzerin	Sigma, Taufkirchen G 7757
Glukose	Merck, Darmstadt 4074
Hämalaun-Färbelösung	Merck, Darmstadt 9249
Hepes (N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure])	Sigma, Taufkirchen H 9136
Hoechst 33342	Sigma, Taufkirchen B-2261
Interferon-γ	Strathmann, IFNg-50
Interleukin-1β	PHB, IL-1β-10
Isoton II (Diluent von Coulter für Flow-Zytometer & Counter)	Coulter, Krefeld 9966071
Kollagen Typ I	IFBM, Leipzig
Kristallviolett	Merck, Darmstadt 1407
Lipopolysaccharid (LPS) von E.coli	Sigma, Taufkirchen L 2630
3-(N-Morpholino) Propansulfonsäure (MOPS)	Gebro, Berlin 1081
Methanol p.A.	Baker, Griesheim 8045

Natriumazetat	Merck, Darmstadt 6268
Natriumbicarbonat	Sigma, Taufkirchen 54019
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt 1540
Natriumdisulfit	Merck, Darmstadt 6528
Natrium-Fluoreszein (Acid Yellow 73)	Sigma, Taufkirchen F 6377
Natriumorthovanadat	Sigma, Taufkirchen S 6508
N,N-Bis(2-hydroxyethyl)glycine, Bicine	Sigma, Taufkirchen B 3876
Osmiumtetroxid-Lösung 4%	Sigma, Taufkirchen 75632
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt 4005
Perjodsäure	Merck, Darmstadt 711B
Pipes	Sigma, Taufkirchen P 8658
Polyethylenglykol	Sigma, Taufkirchen E 4378
Schiff'sches Reagenz	Sigma, Taufkirchen 395-2-016
Silbernitrat	Sigma, Taufkirchen S 8157
Sukrose	Serva, Heidelberg 35579
Tanninsäure	Sigma, Taufkirchen T 0125
Triton X-100	Sigma, Taufkirchen T 6878
TRIS	Roth, Karlsruhe 48552
TRIS-HCl	Sigma, Taufkirchen T 3253
Tumor Nekrose Faktor α (TNF α)	Sigma, Taufkirchen T 2410
Tween 20	Sigma, Taufkirchen P 1379
Wasserstoffperoxid 30 %	Merck, Darmstadt 108597
1,4-diazobicyclo[2.2.2]octan [DABCO]	Sigma, Taufkirchen D 2522
Polyethylenglycol 8000	Sigma, Taufkirchen P 2139

Zur Herstellung von Lösungen wurde Reinstwasser der ELGA-Maxima-Anlage verwendet, welches gegebenenfalls autoklaviert oder sterilfiltriert wurde. Für die direkte Anwendung in der Zellkultur wurde Aqua ad injectabile (Fresenius) eingesetzt.

2.1.2 Enzyme und Chemikalien zur Zelldissoziation

Kollagenase 1	CellSystems, St. Katharinen
Clostridiopeptidase A [EC 3.4.24.3]	CLS-1 4194
neutrale Proteasen, Clostripain, tryptische Aktivität	Lot. Nr. F5P884
Dispase	Sigma, Taufkirchen P 3417
[EC 3.4.24.4]	Lot. Nr. 75H08975
Elastase	CellSystems, St. Katharinen
[EC 3.4.21.36]	2294, Lot. Nr. 39S3586
Elastase	Calbiochem, Darmstadt
[EC 3.4.21.36]	324682, Lot. Nr. B 42866
Trypsin/EDTA [Ethylendiamintetraessigsäure]	Gibco, Karlsruhe 25200-056
[EC 3.4.21.4]	

2.1.3 Antikörper

2.1.3.1 Antikörper zur immunzytochemischen Charakterisierung

Tab. 1: Monoklonale Primärantikörper zur Charakterisierung der isolierten Zellen

Marker/Antigen	Ig-Klasse/ Subklasse	Verdünnung [Peroxi./Fluoresz.]	MoAb/Klon	Best.Nr.
CD 44v6	IgG ₁ , Maus	1:120	VFF-7	NeoMarkers, MS-1093-S
CD 68	IgG, Maus	1:200	PG-M1	Dako, M 876
Zytokeratin AE1/AE3	IgG ₁ , Maus	1:50 -1:100/1:20	AE1:AE3 20:1	Roche Diagnostics, 1124161
Zytokeratin 8	IgG ₁ , Maus	1:15 -1:100/1:20	CAM 5.2 20:1	BD, 439205
Zytokeratin 14	IgG ₃ , Maus	1:100	RCK 107	BD, 550509
Zytokeratin 18	IgG ₁ , Maus	1:80	KS 18.04	Progen, 61028
Zytokeratin 19	IgG ₁ , Maus	1:20	KS 19.1	Progen, 61010
E-Cadherin	IgG ₁ , Maus	1:40	5H9	Monosan, 7024
E-Selektin, [CD 62E]	IgG _{2a} , Maus	1:50 1:200 (EIA)	RR1/1	Bender MedSystems, BMS 110
ICAM-1 [CD 54]	IgG ₁ , Maus	1:100 1:400 (EIA)	RR1/1	Bender MedSystems, BMS 108
Ki 67	IgG ₁ , Maus	1:200	MIB 1	Dako, M7240
PECAM-1 [CD 31]	IgG ₁ , Maus	1:100/1:100	JC/70A	Dako, M 0823
sm α -Actin	IgG _{2a} , Maus	1:400/1:200	1A4	Sigma, A 2547
TTF-1	IgG ₁ , Maus	1:50	8G7G3/1	NeoMarkers, MS-699-P
VE-Cadherin [Cadherin-5]	IgG ₁ , Maus	1:100	75	BD, C 26120
VCAM-1 [CD 106]	IgG ₁ , Maus	1:100 1:100 (EIA)	1.G11B1	Southern Biotechn. Ass. Inc., 9510-01
Vimentin	IgG _{2a} , Maus	1:15	VIM 3B4	Progen, 61013

Als Isotypkontrolle diente Maus IgG₁ von PharMingen Nr. 33811A (0,5 mg/ml) und Dianova CBL 600 (0,2 mg/ml).

Tab. 2: Polyklonale Primärantikörper zur Charakterisierung der isolierten Zellen

Marker/Antigen	Ig-Klasse/Wirt	Verdünnung [Peroxy./Fluoresz.]	Best.Nr.
Caveolin-1	IgG-Fraktion, Kaninchen	1:400/1:300	Santa Cruz, SC-894, N-20, Lot D131
CC-10	IgG-Fraktion, Ziege	1:100	Santa Cruz, SC-7702 C-21, Lot
VWF	IgG-Fraktion, Kaninchen	1:3000/1:1000	Sigma, F 3520
Fibronektin	IgG-Fraktion, Kaninchen	1:400	Sigma, F-3648
SP-A	IgG-Fraktion, Ziege	1:50	Santa Cruz, SC-7699, C-21, Lot F080
SP-B	IgG-Fraktion, Ziege	1:50	Santa Cruz, SC-7702, C-20, Lot G031
SP-C	IgG-Fraktion, Ziege	1:50	Santa Cruz, SC-7705, C-19, Lot H069
proSP-C	IgG-Fraktion, Kaninchen	1:400	Chemikon, AB 3428
SP-D	IgG-Fraktion, Ziege	1:50	Santa Cruz, SC-7708, C-18, Lot E091
ZO-1	IgG-Fraktion, Kaninchen	1:200	Zymed 61-7300, Lot 00761273Q

Tab. 3: Sekundärantikörper zur immunochemischen Charakterisierung der isolierten Zellen bzw. zum Einsatz in Enzym-Immuno-Assays

Marker/Antigen	Ig-Klasse	konjugiert mit	Verdünnung	Best.Nr.
Maus Immunglobuline	IgG-Fraktion, Kaninchen	Peroxidase	1:50	Dako, P0260
Maus Immunglobuline	IgG-Fraktion, Pferd	Biotin	1:200	Vector, BA 2000
Maus Immunglobuline	IgG-Fraktion, Ziege	Peroxidase	1:50	Dako, P0447
Maus Immunglobuline	IgG2a-Fraktion, Ziege	Biotin	1:1000 (EIA)	Cymbus Biotechnology CBL 601
Maus Immunglobuline	IgG1-Fraktion, Ziege	Biotin	1:1000 (EIA)	Cymbus Biotechnology CBL 600
Maus IgG	IgG-Fraktion, Ziege	Alexa 488	Fluor 1:1000	Molecular Probes, A-11029
Maus IgG	IgG-Fraktion, Ziege	Alexa 594	Fluor 1:1000	Molecular Probes, A-21207
Kaninchen Immunglobuline	IgG-Fraktion	Peroxidase	1:10.000	Dianova, 111-035-003
Kaninchen Immunglobuline	IgG-Fraktion	Peroxidase	1:1500	Amersham, NIF 824
Kaninchen Immunglobuline	IgG-Fraktion, Schwein	Peroxidase	1:50	Dako, P0217
Kaninchen Immunglobuline	IgG-Fraktion, Schwein	FITC	1:50	Dako, F0205
Kaninchen IgG (H+L)	F(ab') ₂ -IgG-Fraktion, Esel	LRSC	1:100	Dianova, 711-085-152
Kaninchen IgG	IgG-Fraktion, Esel	Alexa 594	Fluor 1:1000	Molecular Probes,
Kaninchen Immunglobuline	IgG-Fraktion, Esel	Cy-3	1:200	Dianova, 711-165-152
Kaninchen IgG	IgG-Fraktion, Ziege	Alexa 546	Fluor 1:1000	Molecular Probes, A-11010
Ziege Immunglobuline	IgG-Fraktion, Kaninchen	Biotin	1:200	Vector, BA 5000
Ziege IgG	IgG-Fraktion, Esel	Alexa 488	Fluor 1:1000	Molecular Probes, A-11055

2.1.3.2 Antikörper zur immunomagnetischen Zellseparation

Magnetic Beads, PAN-Maus IgG vom Schaf, M-450	DYNAL, 110.22
Anti-CD44v6, Maus IgG ₁	Neomarkers, MS-1093-S
Dynabeads [®] CD31 Endothelial Cell	DYNAL, 111.28

2.1.4 ABC-Komplex

ABC-Komplex Alkalische Phosphatase	Vector, Elite-Kit AK-5000
ABC-Komplex Peroxidase	Vector, Elite-Kit PK-6100

2.1.5 ELISA-Kits zur Messung der biosynthetischen Aktivität

IL-6, human	R & D Systems, DY 206
IL-8, human	R & D Systems, DY 208
MCP-1, human	R & D Systems, DY 279
RANTES, human	R & D Systems, DY 278
sICAM-1	R & D Systems, DY 720
sVCAM-1	R & D Systems, DY 809

2.1.6 Chromogene

o-Phenylen-diamin-dihydrochlorid [OPD]-Tabletten	Sigma, P 7288
3-3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid [DAB]-Tabletten	Sigma, D 5905
Naphthol-AS-Bi-Phosphat	Sigma, N 2250
Dimethylformamid	Merck 1.29370500
Neu Fuchsin, 4% in HCl	Serva, 30293
Natriumnitrit, 4% in aqua dest.	Merck 1.06549.01000
3-5-3'-5'-Tetramethylbenzidin [TMB]-Lösung	R & D Systems, DY 999
o-Phenylen-diamin-dihydrochlorid [OPD] –Tabletten	Sigma, P 7288
Ponceau S	Sigma, P 7767
Serva-Blau G-250	Serva, 35055

2.1.7 Medien und Supplemente zur Kultivierung von Endothel- und Epithelzellen

AEGM	PromoCell, Heidelberg C-21060
ECGM-MV [PC-Medium]	PromoCell, Heidelberg C-90320
Medium 199 [M199], Hepes Modifikation	Sigma, Taufkirchen M 7528 Lot 66H2363
MCDB 131	Gibco, Karlsruhe 10372-019
RPMI 1640	Gibco, Karlsruhe 61870-010
SAGM	CellSystems, St. Katharinen CC-4124
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Gibco, Karlsruhe 15140-114
L-Alanyl-L-Glutamin [Glutamax I]	Gibco, Karlsruhe 35050-038
Fötale Kälberserum [FKS]	Gibco, Karlsruhe 10270-106 Lot 40G7285K
Heparin	Sigma, Taufkirchen H-3149

Die oben genannten Medien hatten bis auf die serumfreien Medien AEGM und SAGM als Vollmedien einen Zusatz von 5 bzw. 15 % FKS und waren mit folgenden Supplementen versehen: Zur Kultivierung von ISO-HAS-1 wurde MCDB 131 5% FKS, bFGF (2,5 ng) und Heparin (10 µg/ml) als Wachstumsfaktoren zugegeben. ECGM-MV, SAGM und AEGM enthielten die Antibiotika Amphotericine B / Gentamycin (50 ng/50 µg/ml) und Glutamin bereits im Medium. ECGM-MV mit bFGF/Heparin (2,5 ng/10 µg/ml) wurde als PC-Medium bezeichnet.

Supplemente:	AEGM (C-21060)	SAGM (CC-4124)
Bovine Pituitary Extract	52 µg/ml	30 µg/ml
Epidermal Growth Factor	0,5 ng/ml	dito
Insulin	5 µg/ml	dito
Hydrokortison	0,5 µg/ml (1,379 µM)	dito
Epinephrin	0,5 µg/ml	dito
Trijodthreonin	6,7 ng/ml	6,5 ng/ml
Transferrin	10 µg/ml	dito
Retinolsäure	0,1 ng/ml	dito
BSA-FAF (BSA fettsäurefrei)	-	0,5 mg/ml

2.1.8 Wachstumsfaktoren

Tab. 4: *Eingesetzte Wachstumsfaktoren und deren biologische Aktivitäten*

	Herkunft	Firma	LotNr.	Biologische Aktivität	Konz.bereich
ECGS [Endothelial Growth Supplement]	Bovines Hirngewebe	BD 40006B	901199	ohne Angabe	50-150 µg/ml
bFGF	human rekomb.	Sigma F0291	46H6764	0.117 ng/ml mit Heparin EC50 Balb/c3T3	3-7 ng/ml (0.5-1 ng/ml +Heparin)
ITS ⁺		BD 354352		ohne Angabe	Insulin/Transferrin je 6,25 µg/ml Selensäure 6,25 ng/ml BSA 1,25 mg/ml Linolensäure 5,35 µg/ml

2.1.9 Reagenzien für die Molekularbiologie

RNeasy Mini Kit	Qiagen, Best.-Nr. 74104
Qiashredder-Säule	Qiagen, Best.-Nr. 79654
RNase-Free DNase-Set	Qiagen, Best.-Nr. 79254
Omniscript Reverse Transcriptase-System	Qiagen, Best.-Nr. 205113
oligo-dT primer	Qiagen, Best.-Nr. SP230
RNase inhibitor	Promega, Best.-Nr. N 2111
Taq DNA polymerase-Kit	Qiagen, Best.-Nr. 201203

2.1.10 Reagenzien für Western Blots

Ammoniumpersulfat (APS)	
Chlorbutanol	Nupage, Kat.Nr. NP0006
ECL Blocking Agens	Amersham, RPN 2125
ECL-Reagenz (SuperSignalWest Dura)	Pierce, 34075
ECL-Reagenz	Amersham, RPN 2106
Hyperfilm	Amersham, RPN

Nonidet P40	Sigma, 74385
NuPage LDS Ladepuffer	NuPage, NP 0007
Polyacrylamid-Gradientengele 4-12%	NuPage TM 4-12% BT 1.0, 2081570-0595
Prestained-Marker	BioRad Precision Prestained, 161-0373
Proteinaseinhibitorgemisch	Sigma, P 8340
PVDF-Membran	Millipore, Immobilon-P 0,45µm, IPV H00010
TEMED	Biorad, 161-0800

2.1.11 Geräte

Bedampfungsanlage	Polaron Instruments, Modell E5100
Brutschränke	Heraeus 6000, Heraeus, Cytoperm 8080
Dampfsterilisator	H+P Labortechnik, Varioklav Typ 500
ELISA-Reader	Titertek Multiscan Plus Mk II, Serial RS 232-C Typ 314
Fluoreszenzmikroskop	Leica, Leitz DMRX
Fluorenenzreader	TECAN, Genesis
Kupferträgernetzchen	G 100 HEX, Science Services
Kühlschrank	Bosch, vario cooler
Kühltruhen	Bosch, electronic luxus, economic no frost
Laser-Scan-Mikroskop	Leica, TCS-NT
Lichtmikroskope	Leica, Inversmikroskop DM IRB Zeiss, Inversmikroskop Telaval 21
Mikrotiterplatten-Washer	anthos labtek instruments, Biotrak
pH-Meter	WTW, 537
Reinstwasseranlage	ELGA, Elgastat Maxima.VF
Rasterelektronenmikroskop	Zeiss, Modell DSM 962
Schüttelwasserbad	Julabo, SW-20C
Sterilisator	WTC Binder, TYP 18115300002020
Sterilwerkbänke	Heraeus, Lamin Air Flow Typ HB 2448
TEER-Messgerät	WPI, EVOM
Thermoblock	Techne, DRI-Block DB·2D
Transmissionselektronenmikroskop	Philips, Modell EM 410

Ultramikrotom	Reichert Jung, Ultramikrotom ultracut
Ultraschallwasserbad	Bandelin, Sonorex TK 52
Vibrationsmischer	Ika Schüttler Vibriofix VF2 Electronic
Waage	Sartorius, LC-420
Wärmeplatte	IKA-Labortechnik, IKAMAG RET-GS
Wärmeschrank	Heraeus, ST 5050
Zellzählgerät	Schärfe-System, CASY 1, Modell TTC
Zentrifuge	Heraeus Sepatech, Labofuge M, Rotor BS 4402/A

Alle Gewebekulturmaterialeien wurden von TPP, die 8-Kammer-Glasobjektträger zur Zellkultivierung von BD und die Thermanox-Deckgläschen von Nunc bezogen.

2.2 Ablösen von Zellen

Trypsinierung

Zum Ablösen adhärenl wachsender Zellen wurde das Medium abgesaugt, einmal mit PBS gewaschen und die Zellen mit Trypsin/EDTA-Lösung (0,25 % Trypsin/0,25 % EDTA in PBS) bei 37°C inkubiert. Nach 5 min erfolgte die Inaktivierung des Trypsins durch Zugabe von serumhaltigem Kulturmedium. Anschließend wurden die abgelösten Zellen in isotonischer Lösung (Isoton II bzw. PBS) oder Medium resuspendiert und zur Zellzählung oder Aussaat auf verschiedene Kulturoberflächen eingesetzt.

Ablösen mit Kollagenase Typ I (CLS I) /EDTA

Empfindlichere adhärenl wachsende Zellen wurden mit Hilfe einer Enzymlösung aus Kollagenase Typ I (0,1%) und EDTA/BSA (0,01%/0,1%) 15 min von der Zellkulturflasche abgelöst, anschließend in PBS oder Medium mit 0,2% BSA aufgenommen und bei 173 g 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet in frischem Kulturmedium aufgenommen und auf die jeweiligen Kulturoberflächen ausgesät.

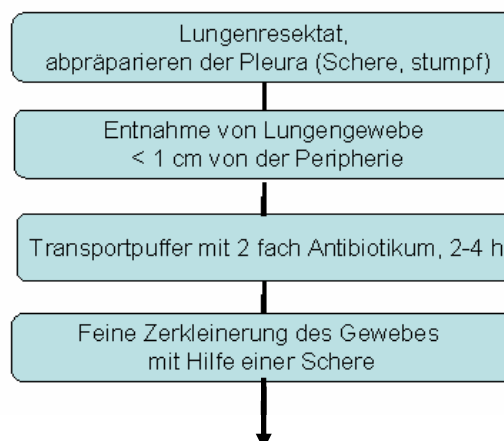
2.5 Isolierung von humanen Typ II Alveolarepithelzellen

Die Isolierung und Kultivierung von ATII Zellen wird von mehreren Arbeitsgruppen mit unterschiedlichen Verfahren durchgeführt, die aber alle auf einer ursprünglich von Kikkawa und Yoneda (Kikkawa und Yoneda, 1974) entwickelten Isolationsmethode beruhen. Durch enzymatischen Aufschluß wird ein Gemisch an Zellen aus dem peripheren Lungengewebe heraus gelöst. Die weitere Selektion erfolgt über die Eigenschaft der ATII Zellen, gegenüber kontaminierenden Zellen langsamer an Gewebekulturplastik zu adhären. Die nach ein bis zwei Stunden nicht adhärenen Zellen werden mittels Dichtgradientenzentrifugation weiter aufgereinigt. Man erhält schließlich nach Dichtgradientenzentrifugation in Percoll eine Interphase mit 80-90% reinen ATII Zellen.

Meist wurden ATII Zellen von Ratten oder Kaninchen isoliert, während nur wenige Studien zur Isolation aus größeren Tieren, einschließlich des Menschen existieren (Edelson et al., 1989; Bingle et al., 1990; Cunningham et al., 1994; Rosseau et al., 2000). Eine standardisierte Methode zur Isolation primärer Alveolarepithelzellen aus Ratte, Kaninchen und Menschen wurde im Rahmen einer Kooperation von 17 Laboratorien in West- und Ost-Europa veröffentlicht (Murphy et al., 1999). Diese Methode nach Murphy wurde in vorliegender Arbeit als Standardmethode genutzt, um die Ausbeute an humanen ATII Zellen (hATII) zu beurteilen.

Die eigene modifizierte Methode kombiniert die Isolierung von mikrovaskulären Endothelzellen und humanen ATII Zellen wie folgt. Zunächst wurde Gewebe aus dem peripheren (< 1cm von Peripherie) subpleuralen Lungparenchym entnommen. Die Pleura visceralis wurde vorsichtig abpräpariert, um eine mögliche Kontamination mit Mesothelzellen zu vermeiden. Das Gewebestück wurde zunächst in einer Transportpufferlösung (MCDB 131, 15 % FKS, 1 % Ciprobay, 1 % Fungizone, Penicillin/Strepto-mycin (10 U/10 µl/ml)) bei 4 °C ca. 2 Stunden gelagert. Anschließend erfolgten die unterschiedlichen enzymatischen Behandlungen nach mechanischer Zerkleinerung des Gewebes. Die einzelnen Isolierungsschritte sind in Abbildung 6 zusammengestellt.

Flußdiagramm der einzelnen Isolierungsschritte:



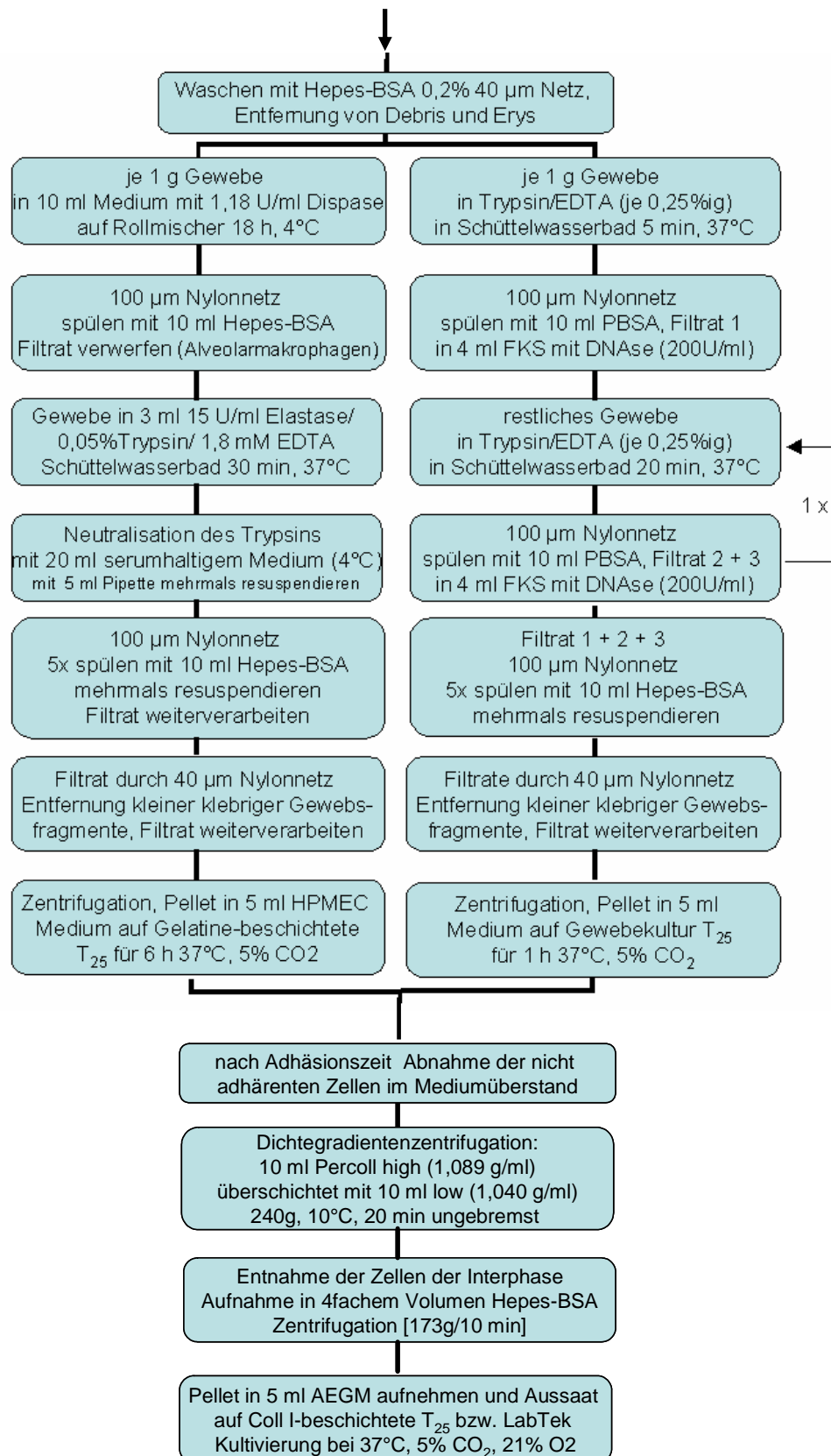


Abb. 6 Gegenüberstellung der unterschiedlichen Isolierungsmethoden für Alveolarepithelzellen vom Typ II als Flußdiagramm: selbst entwickelte, modifizierte Methode (links), Methode nach Murphy et al. 1999 (rechts)

2.5.1 Histologie des Lungengewebes nach Enzymbehandlungen

Das Lungengewebe wurde sowohl nativ als auch nach der jeweiligen Isolationsmethode (nach Murphy (Murphy et al., 1999) bzw. eigener Methode) mit einer Formalinlösung (4 %) fixiert. Nach Paraffineinbettung wurde die Struktur des nicht verdauten Gewebes (Restgewebes) mit Hilfe immunhistologischer Methoden untersucht. Zur Beurteilung der Proben dienten eine Hämatoxylin/Eosin (HE)-Färbung sowie der Nachweis spezieller antigener Determinanten mittels Immunperoxidase-Färbung. Folgende Marker wurden bei der Immunperoxidase-Färbung für die bestimmten Zelltypen verwendet: TTF-1 für Alveolarepithelzellen von Typ II und PECAM-1 (CD 31) für Endothelzellen.

TTF-1 wurde hier eingesetzt, um die Alveolarepithelzellen von Typ II im Restgewebe nachzuweisen. Clarazellen der Bronchiolen, die ebenfalls positiv für TTF-1 sind, werden ebenfalls markiert.

2.5.2 Identifizierung und Quantifizierung der isolierten Epithelzellen

Zur Beurteilung der Reinheit der isolierten Epithelzellen wurden Zytopins der Zellen direkt nach Isolation angefertigt. Dazu wurden 100 µl Zellsuspension in eine spezielle Vorrichtung gegeben, die über eine Öffnung Kontakt zu einem Glasobjektträger hatte, und mit einer Zytocentrifuge für 10 min bei 1500 U/min zentrifugiert. Anschließend wurden die auf dem Glasobjektträger haftenden Zellen (Zytopins) mit Fixierungslösung zum Nachweis der Alkalischen Phosphatase (AP-Kit, Sigma) bzw. mit Merckofix fixiert. Ein anderer Teil der Isolate wurde als P0 auf kollagenbeschichtete LabTek ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert (3-5 Tage). Die LabTek wurden dreimal mit warmem PBS gewaschen und die adhärenen Zellen 15 min mit 3,7%igem PFA in CS-Puffer für die Immunzytochemie bzw. mit 2,5%igem Glutaraldehyd (GA) für die Tanninsäurefärbung bzw. 5 min mit AP-Fixierungslösung (AP-Kit, Sigma) zum Nachweis der alkalischen Phosphatase fixiert.

Zur Identifizierung der isolierten Zellen wurden folgende antigene Determinanten mittels Immunperoxidase-Färbung oder Immunfluoreszenz markiert: TTF-1, CD44v6, SP-A, SP-B, SP-C, SP-D, die Zytokeratine 8, 18 und 19 für Epithelzellen und CD 68 für Monozyten/Makrophagen; smAktin für glatte Muskelzellen; Vimentin für mesodermale Zellen, wie Endothelzellen, Fibroblasten und glatte Muskelzellen.

Die Anzahl der ATII-Zellen in der P0 wurde durch positive Markierung der osmiophilen Lamellar Bodies mit Tanninsäure durch Auszählung bestimmt.

Nachweis der endogenen Alkalischen Phosphatase

- AP-Fixanz: Citratlösung (19 mM Zitronensäure, 9 mM Na-Citrat, 12 mM Natriumchlorid)
65 ml Aceton (reinst)
8 ml Formaldehyd (37%)

Zum Nachweis der Aktivität einer endogenen Alkalischen Phosphatase (AP) wurde ein Färbekit der Firma Sigma verwendet. Dazu wurden die Zellen zur Erhaltung der AP-Aktivität mit AP-Fixanz fixiert. Die Präparate wurden anschließend sofort gefärbt.

Markierung der Lamellar Bodies mit Osmiumtetroxid und Tanninsäure

Zum Nachweis der osmiophilen Lamellar Bodies wurden die auf LabTek kultivierten Zellen mit 2,5 % Glutaraldehyd für 15 min fixiert. Anschließend mit PBS gespült und 90 min mit Osmiumtetroxid (1 %ig in PBS) nachfixiert und dann zweimal mit PBS gespült. Zur weiteren Kontrastierung wurden die Präparate ü.N. in Tanninsäurelösung (1 %ig in PBS, pH = 6,8) bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Spülen mit PBS wurden die Präparate mit Glyceringelatine eingedeckt und die lichtmikroskopische Auswertung der Zellen mit dunkelbraun angefärbten Zelleinschlüssen, den osmiophilen Lamellar Bodies, angeschlossen.

2.5.3 Positive Selektion der Zielzellen: Zellseparation mit Hilfe von CD44v6-Beads

Die Isolierung von Typ II Alveolarepithelzellen erfolgte nach 4-5 Tagen in P0 mittels positiver Selektion über immunomagnetische Partikel, die an einen für hATII Zellen *in situ* spezifischen Marker gekoppelt waren. Als Sekundäntikörper-gekoppelte Beads dienten anti-Maus-IgG-Beads, als spezifischer, primärer monoklonaler Antikörper wurde anti-CD44v6, Maus-IgG₁, eingesetzt.

250 µl Beads (=10⁸ Beads) wurden in einem sterilen Röhrchen 1:20 mit PBSA 0,2 % verdünnt, in den Magnethalter (MPC-1, DYNAL) gesetzt und 5 Minuten separiert. Die klare Flüssigkeit wurde abgesaugt, das Röhrchen aus dem Magnethalter entfernt und die Beads im Ausgangsvolumen (250 µl) PBSA aufgenommen. Die beschriebene Waschprozedur wurde zweimal durchgeführt, um Bruchstücke und nicht gekoppelte Sekundäntikörper zu entfernen. Anschließend erfolgte die Kopplung des primären Antikörpers durch Zugabe von 5 µg (50 µl) anti-CD44v6 (0,2 mg/ml) pro 10⁸ Beads (250 µl). Das Volumen wurde auf 500 µl mit PBSA aufgefüllt, es wurde vorsichtig gemischt und für 1 Stunde bei Raumtemperatur unter ständigem Mischen inkubiert. Nach Kopplung des monoklonalen primären Antikörpers wurden die nicht gebundenen Primäntikörper durch dreimaliges Waschen entfernt und die anti-CD44v6-Beads im Ausgangsvolumen (250 µl) PBSA aufgenommen. Die mit Primäntikörper gekoppelten Beads waren bei 4 °C mindestens sechs Monate stabil.

Zur Zellseparierung wurden 10-15 μl anti-CD44v6 gekoppelte Beads zu einer subkonfluenten T₂₅ (nach ca. 5-6 Tagen in P0 aus ca. 1 g Lungennassgewicht) gegeben. Die Inkubation erfolgte für 10 Minuten bei Raumtemperatur in 6 ml Kulturmedium.

Verhältnis: 2-2,5 μl Beads/ml in 6 ml zu ca. 1×10^6 Zielzellen
4 $\times 10^6$ Beads/ 1×10^6 Zellen

[Herstellerempfehlung: 1×10^7 Beads/ $0,25 \times 10^7$ Zielzellen]

Anschließend wurden die nicht gebundenen Beads mit PBS gewaschen und die Zellen mit 0,2 % EDTA/BSA + 0,1% Kollagenase Typ 1 abgelöst. Die markierten Zellen wurden am Magnet für 5 min bei Raumtemperatur separiert. Die Zielrosetten hafteten an der Röhrenwand, während der Überstand die nicht an Beads gekoppelten Zellen enthielt. Letzterer wurde vorsichtig abgesaugt und gesammelt, das Röhren aus dem Magnethalter entfernt und die Zielzellen in 7 ml PBSA (4-8 °C) resuspendiert und bei 4-8 °C unter ständigem Mischen (Coulter Mixer) 10 min vereinzelt. Diese Waschschritte wurden insgesamt dreimal durchgeführt, wobei die Zielzellen nach dem letzten Separationsschritt in AEGM aufgenommen wurden. Die Aussaat der Zielzellen (positiv isolierte Zellen) erfolgte auf eine mit Kollagen Typ 1-beschichtete T₂₅-Gewebekulturflasche.

Die gesammelten, nicht markierten Zellen (negativ isolierte Zellen) wurden zentrifugiert (173 g/10 min), der Überstand dekantiert, die Zellen in AEGM aufgenommen und ebenfalls auf Kollagen Typ 1-beschichtete T₂₅-Gewebekulturflaschen bzw. LabTek ausgesät.

2.5.4 Charakterisierung der isolierten Zellen

Da keine Abtrennung der Beads vorgenommen wurde, konnten die markierten Zellen während der ersten Tage nach Zellseparation lichtmikroskopisch leicht identifiziert werden.

Eine Charakterisierung der isolierten Zellen folgte im Verlauf der Kultur. Dazu wurden in verschiedenen Passagen $4-5 \times 10^4$ Zellen/ cm^2 auf Kollagen Typ 1-beschichtete ($14 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) LabTek ausgesät, bis zur Konfluenz kultiviert und mit 3,7 % PFA in CS-Puffer fixiert. Anschließend erfolgte eine immunzytochemische Färbung verschiedener zelltypspezifischer Marker. Auch nicht epitheliale Marker, wie sm Aktin für glatte Muskelzellen, Vimentin für Fibroblasten und CD68 für Alveolarmakrophagen wurden untersucht, um eventuell kontaminierende Zellen zu identifizieren.

2.6 Isolierung von humanen pulmonalen mikrovaskulären Endothelzellen

Eine Methode zur Isolierung von humanen pulmonalen mikrovaskulären Endothelzellen (HPMEC) aus peripherem Lungengewebe habe ich bereits in meiner Diplomarbeit etabliert (Hermanns, 1997). HPMEC wurden mit der gleichen enzymatischen Behandlung wie hATII Zellen aus humanem Lungengewebe isoliert (siehe Kap. 2.5). Über einen Adhäsionschritt wurden die Endothelzellen und ein Großteil der Fibroblasten, die innerhalb von 6 Stunden an gelatine-beschichtete Kulturoberflächen anhafteten, von den in Mediumüberstand verbleibenden Epithelzellen getrennt. Die Kultivierung der adhärennten Mischkultur erfolgte für weitere 5 bis 7 Tage in ECGM-MV mit 15% FKS und Zusätzen von 2,5 ng/ml bFGF und 10 µg/ml Heparin. Die HPMEC wurden anschließend mit Hilfe endothelspezifischer Magnetbeads (Dynabeads® CD31 Endothelial Cell) nach Protokoll des Herstellers positiv selektioniert. Zur Erhöhung der Reinheit der Endothelzellen erfolgte eine zweite positive Selektion nach der ersten Passage (P1). Die HPMEC wurden, wenn nicht anders angegeben, in ECGM-MV mit 15% FKS und Zusätzen von 2,5 ng/ml bFGF und 10 µg/ml Heparin kultiviert.

2.7 Monokultur

2.7.1 Untersuchung der Kulturbedingungen für primär isolierte Zellen (HPMEC, hATII)

Um das Proliferations- und Differenzierungs-Verhalten der isolierten Zellen zu beurteilen, wurde deren Proliferation in verschiedenen Medien über eine Kulturdauer von 14 Tagen mittels Zellzählung am CASY I untersucht (siehe Kap. 2.7.3). Dazu wurden kommerziell erhältliche synthetische Medien für die Kultivierung von Zellen des respiratorischen Trakts eingesetzt: SAGM (small airway epithelial cell growth medium) und AEGM (airway epithelial cell growth medium) sowie M199 mit ITS⁺ (1:20), EGF (epidermal growth factor, 10 ng/ml) und BSA (50 µg/ml) als Zusätze und M199 ohne Zusätze.

2.7.2 Entwicklung der Kulturbedingungen für die Ko-Kultivierung der Zell-Linien

Um optimale Kulturbedingungen für die spätere Ko-Kultur zu gewährleisten, wurde das Wachstums- und Differenzierungsverhalten folgender Zell-Linien in Monokultur untersucht:

Zell-Linie	Herkunft	Best. Nr	Empfohlenes Kulturmedium
A549	bronchioalveoläres Adenokarzinom	CCL-185	DMEM + 10% FKS bzw. Häm's F12 + 10% FKS
NCI H441	Adenokarzinom	HTB-174	RPMI + 10% FKS
NCI H820	Adenokarzinom	HTB-181	DMEM + Häm's F12 (DHSF) +SF-Mix *)
ISO-HAS, Klon-1	dermales Hämangiosarkom	eigene Etablierung	M199 + 20% FKS + ECGS/Heparin (50 ng/50 µg/ml)
ST1-6.R	transfizierte HPMEC	eigene Etablierung	M199 + 20% FKS + ECGS/Heparin (50 ng/50 µg/ml)

*) SF-Mix = ITS⁺ (1:60), Ethanolamin (0,01mM), Phosphoethanolamin (0,01mM), Trijodthreonin (0,1nM), Hydrocortison (50 nM), EGF (0,1 µg/ml)

2.7.3 Bestimmung der Proliferation der Zellen mittels Zellzählung am CASY I

Zur Untersuchung der Wachstumseigenschaften wurden die Zell-Linien bzw. Primärzellen jeweils mit einer Dichte von 2×10^4 Zellen/cm² auf 24-Well-Gewebekulturplatten ausgesät. Die weitere Kultivierung erfolgte in 1 ml des zu untersuchenden Mediums. Ein Mediumwechsel erfolgte jeden zweiten Tag. Die Zellzahl wurde während einer Kulturdauer von 14 Tagen regelmäßig mit einem elektronischen Zellzählgerät (CASY 1, Schärfe) ermittelt. Dazu wurden pro Zeitpunkt drei Parallelproben trypsinisiert. Mit Hilfe des CASY 1-Zellzählgerätes erfolgte nun die Bestimmung der Zellzahl pro ml. Aus dieser Zellzahl pro ml ließ sich die Zellzahl pro cm² Kulturfläche errechnen.

2.8 Nachweis von Differenzierungsmarkern mittels Immunfluoreszenz

Bei allen Immunfluoreszenz-Färbungen erfolgte die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen für die Antikörper mit 3 % fettsäurefreiem BSA in PBS. Anschließend wurden verschiedene endotheliale bzw. epitheliale Marker mittels Immunfluoreszenz dargestellt. Dazu wurden die unter 2.1.3.1 beschriebenen antigenen Determinanten mit Fluorochromen (Alexa-Fluor 488 (grün) und Alexa-Fluor 594 bzw. 546 (beide rot)) markiert. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte über Nacht. Anschließend wurden die Präparate einmal mit PBS mit 0,5% Triton X-100 und dreimal mit PBS gespült. Als Sekundärantikörper wurde ein fluorochromgekoppelter (meist Alexa-Fluor 488) Antikörper eingesetzt, der sich gegen die Spezies des Primärantikörpers richtete. Die Inkubationszeit betrug 3 h. Eine Kerngegenfärbung wurde 5 min mit Hoechst 33342 (1 µg/ml) durchgeführt. Nach dreimaligem Spülen mit PBS und einmaligem Spülen mit aqua dest. wurden die Präparate mit Fluoreszenz-Eindeckmedium (Gel Mount) eingedeckt und am Fluoreszenzmikroskop bzw. konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop beurteilt.

Da die Spezies einiger Primärantikörper unterschiedlich war, konnten Doppelfärbungen durchgeführt werden, z. B. anti-Caveolin (Kaninchen)/ anti-E-Cadherin (Maus) oder anti-ZO-1(Kaninchen)/ anti-TTF-1 (Maus). Hier wurde nach der Inkubation mit den beiden Primärantikörpern über Nacht und den oben genannten Spülschritten mit einem Gemisch aus anti-Kaninchen-Alexa-Fluor 594- und anti-Maus-Alexa-Fluor 488-Sekundärantikörpern 3 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Als positive Kontrollen für die endothelialen Marker wurden HUVEC und HPMEC und für die epithelialen Marker NCI H441 eingesetzt. Als Negativkontrolle diente ein Zelltyp, der die jeweiligen Marker nicht exprimiert.

2.9 Western-Blot

Gewinnung des Gesamtzell-Lysats

Lyse-Puffer: 150 mM NaCl 50 mM Tris-Base (pH= 8,0) 1% (v/v) Nonidet P40 (NP-40)

Zell-Lyse-Gebrauchspuffer (frisch):

Lyse-Puffer	1 ml
Proteinaseinhibitorgemisch	2 μ l
200 mM Natrium(ortho)vanadat	5 μ l

Die Zellen einer konfluenten T₂₅ wurden mit Collagenase/EDTA abgelöst, in Eppendorf-Probengefäße mit 500 μ l PBSA 0,1% aufgenommen und bei 1500 U/min für 5 min zentrifugiert. Zu den Pellets wurde 600 μ l Zell-Lyse-Gebrauchspuffer (4°C) gegeben und gut gemischt. Das Lysat war für 30 min auf Eis zu belassen. Anschließend wurden die Probengefäße 10 min bei 13.000 g (4°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert und zur Weiterverwendung bei -20°C eingefroren bzw. ein Aliquot zur Proteinbestimmung verwendet.

Proteinbestimmung der Gesamtzell-Lysate mit dem BCA-Assay

Der bei der Gesamtzell-Lyse gewonnene Überstand wurde mit 0,9%iger NaCl-Lösung 1:10 verdünnt. Die Originalproben wurden auf Eis gelagert. Die Proteinkonzentration der Proben wurde gegen eine Standard-BSA-Verdünnungsreihe (25 μ g/ml bis 2000 μ g/ml) auf einer 96well-Platte nach der Zugabe von 200 μ l Assayfarblösung photometrisch bei einer Wellenlänge von 590 nm in Dreifachbestimmung gemessen. Dazu wurde Reagenz B, bestehend aus Cu(II)SO₄, 1:50 in Reagenz A, gelöst und 200 μ l dieser Assayfarblösung zu 25 μ l Probelösung zugegeben. Dann wurde die 96well-Platte mit Folie abgeklebt und zur Farbentwicklung 30min bei 37°C inkubiert. Mit Hilfe der Messdaten der eingesetzten Standard-BSA-Verdünnungsreihe wurde eine Eichkurve erstellt und die Proteinkonzentrationen der Proben ermittelt.

Proteinauftrennung mittels NuPage Bis-Tris System (pH 7 beim Gel-Lauf)

Beim Nachweis von proSP-C wurden gebrauchsfertige Polyacrylamid-Gradientengele 4-12% verwendet. Es wurde eine Probenmenge von 8 μ g Protein eingesetzt. Der 4fach Probenpuffer (Nupage LDS Ladepuffer) wurde entsprechend $\frac{1}{4}$ des Volumens der Probe zugegeben. Gleichzeitig wurde der Prestained-Marker als Molekulargewichts-Standard vorbereitet. Die Denaturierung der Proben erfolgte bei 95°C für 3 min.

Das SDS-Polyacrylamidgel wurde in die Vertikalgelelektrophoresekammer überführt. Die Taschen wurden mit Elektrophoresepuffer gespült und mit den Proben versehen.

Kammer:	Sure Lok (Invitrogen)
Elektrophoresepuffer:	50 mM MOPS, 50 mM Tris Base, 1 mM EDTA 0,1% (w/v) SDS (MOPS SDS, pH= 7,7)

An das Gel wurde zunächst für 20 min eine Spannung von 120V (128mA) angelegt. Dann erfolgte die weitere Auftrennung der Proteine für 55 min bei einer Spannung von 140V (100mA). Anschließend wurde das Sammelgel entfernt und das Trenngel markiert.

Western-Blot

Gelelektrophoretisch separierte Proteine sind im Gel weiteren immunologischen Analysen schwer zugänglich. Daher wurden die Proteine und deren Trennkonfiguration für den Nachweis von proSP-C mittels Nasstransfer aus dem Gel auf eine Nitrozellulose-Membrane geblottet und immobilisiert. Nach Inkubation der auf der Membran präsentierten Proteine mit primären mono- oder polyklonalen Antikörpern wurden die resultierenden Immunkomplexe mittels eines sekundären peroxidasekonjugierten Antikörpers unter Verwendung des ECL-Systems visualisiert.

Nasstransfer

Beim Nachweis von proSP-C wurde der Nasstransfer anderen Blottingmethoden vorgezogen. Eine Nitrozellulose-Membran (0,45 µm) wurde entsprechend des Formates des Trenngels zurechtgeschnitten und in Transferpuffer äquilibriert.

Transferpuffer: 25 mM Bicine, 25 mM Bis-tris (freie Base), 1 mM EDTA
0,05 mM Chlorbutanol (pH= 7,2)

Für den Transfer des Proteins aus dem Gel auf die Membran wurde die Kassette sandwichartig zusammengebaut. Folgende Schichtung war, mit der schwarzen Seite beginnend, einzuhalten: getränkter Schwamm, getränktes Whatmanpapier, Gel, Nitrozellulose-Membran, getränktes Whatmanpapier, getränkter Schwamm. Luftblasen waren bei jeder neuen Lage mit einer Walze auszustreichen.

Unter Beachtung der Polung wurde die Kassette in die Transferkammer (X-Cell Sure Lock) eingesetzt. Die Kammer wurde mit Transferpuffer aufgefüllt. Nun wurde für 75 min eine Spannung von 30 V (130-153 mA) angelegt.

Das Gel wurde auf vollständigen und gleichmäßigen Transfer mit Hilfe der Coomassie-Färbung überprüft. Dazu wurde das Gel für 5 min in Coomassie-Blau gefärbt und mittels Entfärber differenziert. Die Färbelösung wurde vor Gebrauch filtriert.

Coomassie-Färbelösung	Coomassie-Entfärbung
4 Tabletten Serva-Blau G-250	300ml aqua dest.
125ml aqua dest.	150ml Methanol
100ml Methanol	50ml Essigsäure
25ml Essigsäure	

Um nachzuweisen, ob die Proteine gleichmäßig auf die Membran geblottet wurden, wurden diese für 1min mit Ponceau-S angefärbt. Anschließend wurde die Membran in aqua dest. geschwenkt bis die Proteinbanden sichtbar waren. Eine Entfärbung der Proteinbanden erfolgte in 0,1% TBST.

Immunochemischer Nachweis

Waschpuffer:	10 mM TrisHCl, 150 mM NaCl (pH = 7,5) 0,1% Tween 20 (0,1% TBST)
5%-ige Milchpulver-Waschpuffer-Lösung:	5g Milchpulver je 100 ml Waschpuffer
5%-ige BSA-Waschpuffer-Lösung:	0,5g BSA (Sigma, A-7638) je 10 ml Waschpuffer

Für mindestens 1h wurde die Membran in 5%-iger Milchpulver-Waschpuffer-Lösung gelagert, um unspezifische Proteinbindungsstellen zu blockieren. Nun wurde dreimal 5min mit 0,1% TBST gewaschen. Danach wurde die Membran ü.N. bei 4°C mit dem primären Antikörper gegen proSP-C in einer Verdünnung von 1:1000 in 5%-iger BSA-Waschpuffer-Lösung inkubiert. Anschließend wurde fünfmal 5min mit 0,1% TBST gewaschen. Jetzt war die Membran 1 h mit dem sekundären Antikörper (anti-rabbit HRP, Dianova) in 5%-iger Milchpulver-Waschpuffer-Lösung bei Zimmertemperatur in einer Verdünnung 1:10.000 zu inkubieren. Erneut musste fünfmal 10min mit Waschpuffer-Lösung gewaschen werden. In der Waschlösung wurde die Membran in die Dunkelkammer überführt.

Photographische Auswertung der Membranen in der Dunkelkammer

Eine ausreichende Menge an Peroxidasesubstrat Luminol und dem Ko-Substrat H₂O₂, die den Substratlösungen A und B des ECL-Systems entsprechen, wurde 1:1 gemischt und die Membranen 1min damit inkubiert. Mit der Proteinseite nach oben legte man dann die Membranen auf eine gereinigten Plastikfolie, saugte das überschüssige ECL ab und deckte mit einer weiteren Folie die Membranen ab. Lufteinschlüssen wurden ausgestrichen. Die eingepackten Membranen wurden in eine Fotokassette überführt und ein entsprechender Filmstreifen (Hyperfilm ECL, Amersham) auf der Membran positioniert. Die Belichtungszeit, die anfänglich 1 min betrug, wurde nach dem Entwickeln und Fixieren optimiert, indem man ein ideales Verhältnis von Belichtungs- und Entwicklungszeit suchte.

2.10 Nachweis der mRNA-Expression mittels RT-PCR**Isolierung der Gesamt-RNA aus Zellen**

Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte mit Hilfe des RNeasy Mini Kits. Das Prinzip der Isolierung beruht auf einer selektiven Ausfällung von RNA-Molekülen mit einer Länge von mehr als ca. 200 Basen und der Bindung an eine Silikagelmembran bei definierten Salzkonzentrationen. Kleinere Moleküle wie 5.8 S RNA, 5 S RNA und tRNA binden aufgrund ihrer geringeren Größe von ca. 160, 120 bzw. 70-90 Nukleotiden nicht und werden eluiert. Alle Arbeitsschritte wurden bei Raumtemperatur ausgeführt. Vor Beginn der Extraktion wurden die Zellen abtrypsiniert und in Eppendorfreaktionsgefäßen 1 min zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstands wurde das Zellpellet in 350 µl Lysispuffer RLT mit 1% 2-Mercaptoethanol aufgenommen. Das im Puffer enthaltene Guanidin-Isothiocyanat und das zugesetzte Mercaptoethanol besitzen starke denaturierende

Eigenschaften und dienen unter anderem der Inaktivierung von RNasen. Im Anschluss wurde die Suspension in eine Qiasredder-Säule überführt und in einer Zentrifuge bei 10.000 x g 3 min lang durch die auftretenden Scherkräfte homogenisiert und das Homogenat mit 350 µl 70 %igem Ethanol versetzt. Anschließend wurde das Homogenat in 70 %igem Ethanol auf eine RNeasy Mini-Säule aufgebracht, 15 s bei 10.000 x g zentrifugiert und mit 350 µl Puffer RW1 (15 s, 10.000 x g) gewaschen. Um eine Amplifikation genomischer DNA bei der quantitativen PCR zu vermeiden erfolgte ein DNase-Verdau auf der Säule für 15 min bei Raumtemperatur. In den folgenden Schritten wurde, um Salze und Proteine von der Membran zu entfernen, mit 350 µl Puffer RW1 (15 s, 10.000 x g) und zweimal mit 500 µl Puffer RPE (15 s, 10.000 x g, bzw. 2 min 10.000 x g) gewaschen. Die Pufferlösungen wurden vom Hersteller mitgeliefert. Das jeweils anfallende Eluat wurde verworfen. Die nun noch an das Silikagel gebundene RNA konnte durch Auftragen von 50 µl RNase-freiem Wasser gelöst und abzentrifugiert (1 min, 10.000 x g) werden. Die Lagerung der so gewonnen in DEPC-behandeltem Wasser gelösten RNA erfolgte bei -80°C.

Reverse Transkription

Zur Synthese der komplementären DNA (cDNA) wurde das Omniscript Reverse Transcriptase-System der Firma Qiagen verwendet. Reagenzien und Gesamt-RNA wurden auf Eis aufgetaut, kurz auf einem Vibrationsmischer gemischt und zentrifugiert. Bei einem Reaktionsvolumen von 20 µl für jede RNA-Sammelprobe wurden pro Ansatz folgende Komponenten zu einem Mastermix zusammengegeben und gut gemischt:

Tab. 5: Mastermix für die reverse Transkription

	Volumen pro Reaktion	Endkonzentration
Buffer RT (10x) *	2,0 µl	Buffer RT (1x)
dNTP Mix (5 mM pro dNTP) *	2,0 µl	0,5 mM pro dNTP
oligo-dT primer (10 µM)	2,0 µl	oligo-dT primer 1,0 µM
RNase inhibitor (10 units/µl)	1,0 µl	10 units pro Reaktion
Omniscript Reverse Transcriptase (4 U) *	1,0 µl	4 units pro Reaktion
RNase-freies Wasser	2 µl	
Template RNA		
	10 µl Template (RNA 1 µg/10 µl)	1 µg

* vom Hersteller mitgeliefert

Pro Ansatz wurden 13 µl des Mastermix in ein 500 µl-Reaktionsgefäß gegeben und 10 µl in DEPC-behandeltem Wasser gelöste Gesamt-RNA hinzugefügt. Die Reaktion erfolgte in einem programmierbaren Thermoblock bei 37°C für 60 min. Das Produkt wurde direkt in die PCR eingesetzt oder bei -20°C gelagert.

Tab. 6: Eingesetzte Primer für die RT-PCR

untersuchte mRNA-Spezies (Genbanknummer)		Schmelzpunkt (bei 100 mM NaCl)	Sequenz (5' → 3')	Produkt-Länge
CC-10 (Genbank Accession No X13197)	Forward Primer	59,4°C	5'-CCACCATGAAACTCGGTGTC-3' (bases 3-22)	348 bp
	Reverse Primer	61,0°C	5'-GTGGGCGTGGACTCAAAGC-3' (bases 333-351)	
CD 44v6 (Genbank Accession No AJ251595)	Forward Primer	57,3°C	5'-CAG GCA ACT CCT AGT AGT AC-3' (bases 1334-1353)	807 bp
	Reverse Primer	60,3°C	5'-CCA AGA TGA TCA GCC ATT CTG G-3' (bases 2120-2141)	
SP-C (Genbank Accession No BC 005913)	Forward Primer	57,3°C	5'-AGCAAAGAGGTCCTGATGGA-3' (bases 44-63)	405 bp
	Reverse Primer	57,3°C	5'-CTAGTGAGAGCCTCAAGACT-3' (bases 428-443)	
SP-D (Genbank Accession No NM 003019)	Forward Primer	53,2°C	5'-AAG CAG AAA TGA AGA CCT AC-3'	470 bp
	Reverse Primer	60,5°C	5'-GAC TCC ACG CTC ACC AGG-3'	
VCAM-1	Forward Primer	57,3°C	5'-TCT CAT TGA CTT GCA GCA CC-3'	282 bp
	Reverse Primer	59,8°C	5'-ACT TGA CTG TGA TCG GCT TCC-3'	
housekeeping Gen (Genbanknummer)		Schmelzpunkt (bei 100 mM NaCl)	Sequenz (5' → 3')	Produkt-Länge
Aktin	Forward Primer	64,2°C	5'-ACG ATT TGC GGT GGA CGA TGG AG-3'	574 bp
	Reverse Primer	60,3°C	5'-GAC CTG ACT GAC TAC CTC ATG A -3'	

Tab. 7: Mastermix für die PCR (Reagenzien pro Ansatz / 25 µl)

	Volumen pro Reaktion	Endkonzentration
PCR-Puffer (10x) *	2,5 µl	PCR-Puffer (1x)
dNTP Mix (10 mM pro dNTP) *	0,5 µl	200 µM pro dNTP
ForwardPrimer (10 pmol/µl)	0,5-2,0 µl	5-20 pmol (0,2-0,8 µM)
Reverse Primer (10 pmol/µl)	0,5-2,0 µl	5-20 pmol (0,2-0,8 µM)
Taq DNA polymerase (5 units/µl)	0,125 µl	0,625 units
RNase-freies Wasser	15,875-12,875 µl	
cDNA-Probe		
	5 µl cDNA (50 ng/1 µl)	250 ng

* vom Hersteller mitgeliefert

Die einzelnen Komponenten wurden entsprechend der Anzahl an Reaktionen auf Eis zusammengegeben und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gemischt. Nach dem Aliquotieren erfolgte die Zugabe von 5 µl gelöster cDNA, bzw. bei den Negativkontrollen von 5 µl sterilem Aqua dest.

Tab. 8: Zeit-Temperatur-Profile der PCR

untersuchte mRNA-Spezies	Initiale Denaturierung	Denaturierung	Annealing und Extension
CC-10		94°C, 30 sec	57°C, 30 sec – 72°C, 30 sec
CD 44v6		94°C, 45 sec	51°C, 60 sec – 72°C, 120 sec
SP-C	94°C, 2 min	94°C, 30 sec	57°C, 30 sec – 72°C, 30 sec
SP-D		94°C, 30 sec	58°C, 60 sec – 72°C, 60 sec
VCAM-1		94°C, 30 sec	62°C, 30 sec – 72°C, 30 sec
Aktin		94°C, 30 sec	65°C, 60 sec – 72°C, 30 sec

Thermocycler Applied Biosystems (Gene Amp PCR System 9700)

Es wurden bis auf CD44v6 mit 30 Zyklen bei allen PCR Läufen 35 Zyklen gefahren.

2.11 Elektronenmikroskopie

Nach einer Kultivierungsdauer von 7 bis zu 14 Tagen wurden die Ko-Kulturen auf Membraneinsätzen einmal mit PBS gespült und mit 2,5% GA (Glutaraldehyd) in PBS fixiert. Die Ko-Kulturen wurden bis zur weiteren Aufarbeitung in der Elektronenmikroskopie in eine 7%ige Sukroslösung überführt.

Die Aufarbeitung der fixierten Zellen für das Transmissionselektronenmikroskop (TEM) erforderte eine Nachfixierung mit 1% Osmiumtetroxid für 2 h bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Zellen mittels aufsteigender Alkoholreihe dehydriert. Nach einer Zwischenbehandlung der Präparate mit Propylenoxid wurden diese in Agar 100 Resin eingebettet und für 24 h bei 60°C polymerisiert. Semidünn- und Ultradünnschnitte wurden mit einem Ultramikrotom angefertigt und die

Ultradünnschnitte weiter auf Kupferträgernetzchen mit quadratischen Maschen (Grids) transferiert. Die ultrastrukturelle Analyse und Photomikroskopie erfolgte am Transmissionselektronenmikroskop der Firma Philips Modell EM 410.

Die Aufarbeitung zur Rasterelektronenmikroskopie (REM) erfolgte nach Fixierung mit 1% Osmiumtetroxid für 2 h und anschließender Lufttrocknung der Präparate. Die Proben wurden auf kohlenstoffbeschichtete Metallplatten (Neubauer, Münster) aufgebracht und mit Gold bedampft. Die mit Zellen bewachsenen Filtermembranen wurden anschließend am Rasterelektronenmikroskop (REM Zeiss, Modell DSM 962) analysiert.

2.12 Nachweis sekundärer inflammatorischer Mediatoren mittels ELISA

Zunächst wurden die epithelialen Zell-Linien (NCI H441, NCI H820 und A549) in einer Dichte von 4×10^4 Zellen/cm² auf Kollagen 1-beschichtete Gewebekultur-Mikrotiterplatten ausgesät. Für die Primärzellen (hATII, HPMEC) sowie die endotheliale Zell-Linie ISO-HAS-1 wurde eine größere Dichte von 5×10^4 Zellen/cm² eingesetzt. Die alveolären und endothelialen Primärzellen wurden in verschiedenen Passagen, wie in den einzelnen Versuchen im Ergebnisteil angegeben, untersucht. Die Adhäsionszeit betrug 1-2 Tage bei Kurzzeitkulturen und 11 Tage bei Langzeitkulturen, bei letzteren wurde die Zellzahl der Aussaat entsprechend der Ko-Kultur mit 2×10^4 Zellen/cm² für NCI H441, NCI H820, A549 bzw. 5×10^4 Zellen/cm² für primäre hATII Zellen gewählt. Die Zellen wurden dann den Stimulanzien TNF- α (300U/ml), IL-1 β (100U/ml) und LPS (1 μ g/ml) in MCDB 131 mit 5 % FKS, bFGF (2,5ng/ml) und Heparin (10 μ g/ml) bzw. AEGM (primäre hATII Zellen) für unterschiedliche Zeiten (4 bis 48 h, siehe Ergebnisteil) ausgesetzt. Anschließend wurden die Mediumüberstände abgenommen und bei -20°C bis zur Analyse aufbewahrt.

Prinzip Die Konzentration von Zytokinen im Kulturüberstand wurde mittels „enzyme linked immuno sorbent assay“ (ELISA) bestimmt. Beim Sandwich ELISA wurden 96-Well-Platten mit einem für das zu bestimmende Zytokin spezifischen Antikörper beschichtet, freie Bindungsstellen mit einer Albumin/Sucrose-Lösung abgesättigt und nach Bindung des Zytokins ein zweiter spezifischer biotinylierter Antikörper gekoppelt. Das Zytokin war nun von zwei Seiten an spezifische Antikörper gebunden (Sandwich). An das biotinylierte Ende des zweiten spezifischen Antikörpers band peroxidase-gekoppeltes Streptavidin mit hoher Affinität. Als Chromogen für die Peroxidase-Reaktion wurde Tetramethylbenzidin (TMB) verwendet. Die Absorption dieses Farbstoffs wurde nach Abstoppen der Reaktion mit 1 mM H₂SO₄-Lösung und Umwandlung zu einem gelben Reaktionsprodukt bei 450 nm spektralphotometrisch bestimmt. Über den Vergleich mit der Absorption von Standardproben des jeweiligen Zytokins (Verdünnungsreihe mit bekannten Konzentrationen) konnte die Zytokinkonzentration anschließend berechnet werden.

Material	ELISA-Platten (MaxiSorp [®] C96, Nunc)
Waschpuffer	PBS + 0,05% Tween
Probenpuffer	PBSA 1% (für MCP-1, RANTES) TRIS + 0,1% BSA (für IL-6, IL-8)
Substratpuffer	PBSA 1% (für MCP-1, RANTES) TRIS + 0,1% BSA (für IL-6, IL-8)
Blockierungspuffer	PBS + 1% BSA + Sucrose + NaN ₃
Capture-Antikörper	`Capture`-Antikörper in angegebener Konzentration in PBS verdünnen und mit 100 µl pro Well ü.N. bei Raumtemperatur beschichten
Detektions-Antikörper	`Detection`-Antikörper in angegebener Konzentration in Probenpuffer verdünnen und mit 100 µl pro Well beschichten
Standards	MCP-1 bzw. Rantes (Konz.) Verdünnungen: 1000; 500; 250; 125; 62,5 31,25; 15,625 pg/ml IL-6 (Konz.) Verdünnungen: 300; 150; 75; 37,5 18,75; 9,375; 4,6875 pg/ml IL-8 (Konz.) Verdünnungen: 2000; 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25 pg/ml
Substratlösung	Tetramethylbenzidin Zugabe von 0,1% Wasserstoffperoxid
Stopplösung	1 mM Schwefelsäure

Die Messung der Zytokinfreisetzung in den Kultur-Überstand mit und ohne Stimulation wurde mittels im Handel erhältlicher ELISA-DuoSet Kits der Firma R&D Systems, Wiesbaden, durchgeführt. Die Nachweisgrenze des IL-6-ELISA's lag im linearen Bereich bei 300 pg/ml. Für MCP-1 und RANTES lag die Nachweisgrenze im linearen Bereich bei 1000 pg/ml und für IL-8 bei 2000 pg/ml.

2.13 Bestimmung der Zelladhäsionsmoleküle (CAMs) mittels EIA und ELISA

2.13.1 ELISA zum Nachweis von sICAM-1 und sVCAM-1

Die Messung der Freisetzung löslicher (soluble, s) Formen der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 in den Kultur-Überstand wurde ebenfalls mittels ELISA-DuoSet Kits der Firma R&D Systems, Wiesbaden, durchgeführt. Die Nachweisgrenze der Sandwich-ELISA's lag im linearen Bereich bei 1000 pg/ml.

Der Versuchsaufbau entsprach dem bei der Bestimmung von MCP-1 und RANTES (siehe Kap. 2.12). Als Standards wurde eine Verdünnungsreihe von sICAM-1 bzw. sVCAM-1 mit Konzentrationen von 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625 pg/ml eingesetzt.

2.13.2 CAM-EIA zum Nachweis membranständiger Adhäsionsmoleküle

ATII, NCI H441, NCI H820 und A549 wurden parallel in einer Dichte von 4×10^4 Zellen/cm² auf Kollagen 1-beschichtete Gewebekultur-Mikrotiterplatten ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Die Zellzahl bei HPMEC und ISO-HAS-1 betrug 5×10^4 Zellen/cm². Anschließend wurden die Zellen für 4, 6, 16, 24 bzw. 48 h mit den Zytokinen TNF- α (300 U/ml) und IL-1 β (100 U/ml) sowie LPS (1 μ g/ml) stimuliert. Die Platten wurden zweimal mit warmem PBS (37°C) gewaschen und 15 min mit Methanol/Ethanol (2:1; v:v) fixiert. Nachfolgend wurde wie zuvor gewaschen und die Platten bis zur Bestimmung der Adhäsionsmolekül-Expression über Nacht bei 4°C in PBS gelagert.

Das PBS der Multiwell-Platten wurde dekantiert. Anschließend wurden die Zellen zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen für die Antikörper sowie zur Absättigung zelleigener Peroxidasen für 30 min bei 37°C in Blocking-Reagenz mit 1% H₂O₂ inkubiert. Nachfolgend wurden die jeweiligen monoklonalen Antikörper ICAM-1 bzw. VCAM-1 und E-Selektin (bei Endothelzellen) in den unter 2.1.3.1 genannten Verdünnungen in Blocking-Reagenz zugegeben. Zur Erhöhung der Sensitivität des Assays wurde ein Biotin-Streptavidin-System eingesetzt. Die Entwicklung des Assays erfolgte mittels Umsetzung von o-Phenylendiamin-dihydrochlorid (OPD). Die Extinktion der Wells wurde nach dem Abstoppen der Reaktion mit 4 M HCl im ELISA-Reader bei $\lambda = 492$ nm gemessen.

In einigen Versuchen wurden die Epithelzellen (primäre hATII Zellen, NCI H441 und NCI H820) unter gleichen Bedingungen und in gleicher Zellzahl/cm² wie in Ko-Kultur (2×10^4 Zellen/cm² für NCI H441, NCI H820 bzw. 5×10^4 Zellen/cm² für primäre hATII Zellen) in 96 Well Platten ausgesät und 11 Tage kultiviert. Durch die Wahl des gleichen Kulturmediums und der gleiche Kultivierungsdauer wie bei der späteren Ko-Kultur, sollte ein mit der Ko-Kultur vergleichbarer Differenzierungszustand der Epithelzellen in Monokultur erhalten werden. Die Expression von Zelladhäsionsmolekülen (CAMs) bei NCI H441 bzw. NCI H820 wurde vergleichend mit der von A549 untersucht. Ebenso wurde die CAM-Expression von getrennten primären hATII* (CD44v6⁺) Zellen vergleichend mit der von ungetrennten hATII* Zellen auf einer Platte untersucht. Als Kontrolle zur Einschätzung der im Well befindlichen Epithelzellen wurde im Anschluss an den CAM-EIA eine Kristallviolett-färbung durchgeführt (siehe Messung der Gesamtproteinmenge durch Färbung mit Kristallviolett).

2.13.3 Messung der Gesamtproteinmenge durch Färbung mit Kristallviolett

Nach dem CAM-EIA wurden die fixierten Zellen mit 0,05 % Tween 20 in PBS dreimal gewaschen und mit 50 μ l/Well 0,1 %iger Kristallviolett-Lösung für 20 min unter Schütteln gefärbt.

Die überschüssige Farbe wurde mit Leitungswasser im Wasserbecken gut ausgewaschen und die Platten über Nacht getrocknet. Dann wurden die zellgebundenen Farbkristalle auf dem Schüttler für ungefähr 10-15 min in 100 μ l/Well 33 %iger Essigsäure gelöst. Die Messung der optischen Dichte erfolgte nach Übertragung in eine neue Mikrotiterplatte bei $\lambda = 600$ nm im ELISA-Reader.

2.14 Etablierung des Ko-Kulturmodells

2.14.1 Kultivierung auf HTS 24-Transwell Filterplatten

Aufgrund der engen Wechselwirkungen zwischen Alveolarepithelzellen und mikrovaskulären Endothelzellen in der Alveolareinheit *in situ* sollte ein *in vitro* Modell mit beiden Zelltypen für toxikologische, mikrobielle sowie pathophysiologische Studien entwickelt werden. Um den dreidimensionalen Aufbau der alveolo-kapillären Einheit *in vitro* zu imitieren, wurde ein Modellaufbau gewählt, bei dem beide Zellen in engem Kontakt auf beiden Seiten einer dünnen mikroporösen Filtermembran als Bilayer ko-kultiviert wurden. Dadurch entstehen zwei getrennte Kompartimente: (1) das obere Well, das der Kulturfläche oberhalb der Epithelzellen (auf Oberseite der Filtermembran), die das alveoläre Lumen nachahmen soll, entspricht und (2) das untere Well, das die Kulturfläche oberhalb der Endothelzellschicht (auf Unterseite der Filtermembran) darstellt und somit dem kapillären Lumen entspräche (Abb. 7).

Zum Erhalt statistisch auswertbarer Versuche waren Mehrfachbestimmungen (3 bis 4fach Bestimmungen) für jeden Ko-Kultur-Ansatz eine notwendige Voraussetzung. HTS 24-Transwell Filterplatten stellen ein geeignetes System für Mehrfachbestimmungen dar. Sie bestehen aus 24 einzelnen Transwells, die zu einer 24 Well Filterplatte zusammengefasst sind. Auf HTS 24-Transwell Filterplatten steht der epithelialen sowie der endothelialen Zellschicht eine Fläche von 0,33 cm² je Well zur Verfügung, was ungefähr der Fläche einer 96-Well-Platte entspricht.

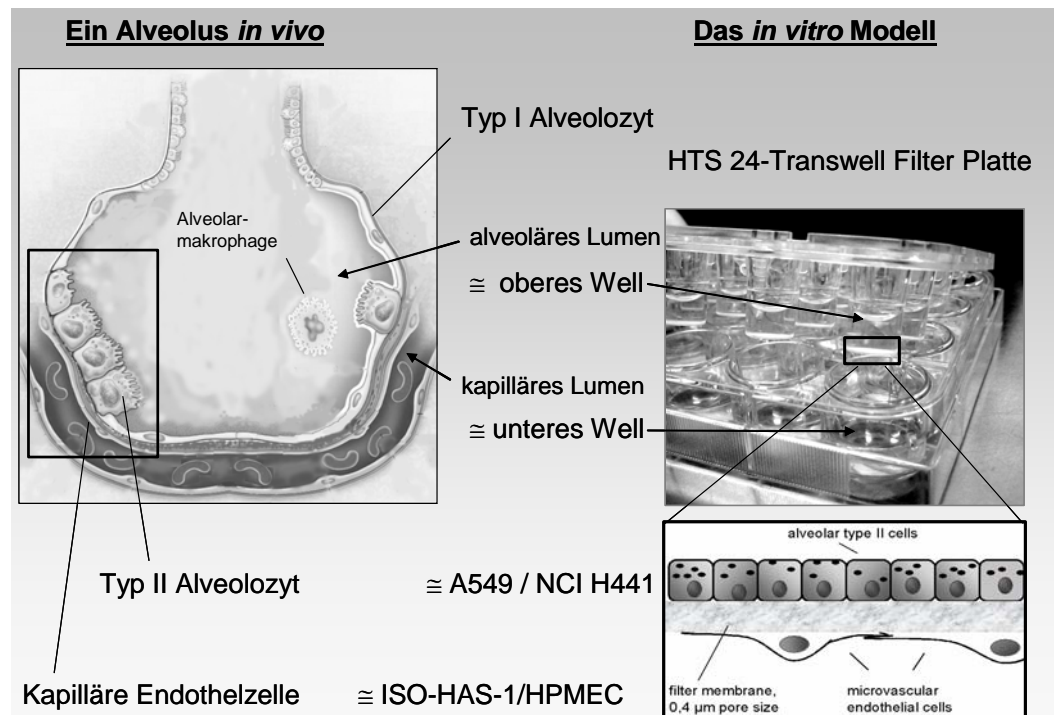


Abb. 7 Schematische Darstellung eines Querschnitts durch einen Alveolus (links) im Vergleich zum Ko-Kulturmodell auf einer HTS 24-Transwell Filterplatte: Die Vergrößerung zeigt schematisch einen einzelnen Transwell mit Epithelzellen auf der Oberseite des Membranfilters in Ko-Kultur mit Endothelzellen auf der Unterseite des Membranfilters (rechts).

Aussaat der Zellen auf Filtermembranen

Die Aussaat der Zellen erfolgte in zwei Schritten:

(1) Zunächst wurde die HTS 24-Transwell Filterplatte in umgekehrter Position in den Deckel der zugehörigen Gewebekulturplatte (Cluster-Plate) gesetzt und eine Endothelzellsuspension (erhalten durch Trypsinierung) mit einer Zellzahl von $3,3 \times 10^5$ Zellen/ml in einer Volumenmenge von $50 \mu\text{l}$ auf die Unterseite des Filters gegeben (resultierend 5×10^4 Zellen/cm²). Anschließend wurde die HTS 24-Transwell Filterplatte in umgekehrter Position mit einer sterilen Abdeckplatte bedeckt (die Tropfen mit Zellsuspension dürfen nicht berührt werden!) und für 2 h im Brutschrank (37°C, 5% CO₂, 95% relative Luftfeuchte) inkubiert. Während dieser Zeit kam es zur Adhärenz der Endothelzellen an die Filtermembran. Im Anschluß wurde die Gewebekulturplatte vorsichtig umgedreht, d. h. in die richtige Position gebracht, und pro Well in die untere Kammer langsam je 1 ml Medium zugegeben.

(2) Danach wurden die Epithelzell-Linien mit Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst, eine Zellzahl von $3,33 \times 10^4$ Zellen/ml eingestellt und davon $200 \mu\text{l}$ in jedes obere Well (obere Kammer) der HTS 24-Transwell Filterplatte pipettiert (resultierend 2×10^4 Zellen/cm²). Die primären hATII Zellen wurden, sofern nicht anders angegeben, abweichend von den Zell-Linien in einer Zellzahl von 5×10^4 Zellen/cm² ausgesät.

Für Monokulturen erfolgte die Aussaat nur eines einzelnen Zelltyps auf der jeweiligen Seite der Filtermembran, d. h. für die Endothelzellen auf der Unterseite und für die Epithelzellen entsprechend im oberen Well (auf der Oberseite der Filtermembran).

Die weitere Kultivierung erfolgte für 10 bis 14 Tage im Brutschrank. Ein Mediumwechsel wurde jeden zweiten bis dritten Tag durchgeführt.

2.14.2 TER-Messung

Der transzelluläre elektrische Widerstand durch die Zellschicht von Epithel- oder Endothelzellen bzw. der elektrische Widerstand durch den Bilayer (transcellular/transbilayer electrical resistance = TER) wurde im Verlaufe der Kultivierung auf Membranfiltern mit Hilfe eines kombinierten Millivolt- / Ohm-Meters (EVOM), das mit einer Ag/AgCl-Elektrode ausgestattet war, ermittelt. Vor der Messung wurde zunächst ein Mediumwechsel durchgeführt, dann erfolgte eine einstündige Adaption der Zellen an das Medium bei 37°C im Brutschrank. Anschließend wurden die TER-Werte bei Raumtemperatur ermittelt, indem ein Wechselstrom im Milliampere-Bereich zwischen Oberseite und Unterseite der Zellschicht bzw. des Filters angelegt wurde. Dazu wurde der kürzere Schenkel der Ag/AgCl-Elektrode in den Membraneinsatz und der längere Schenkel in das Medium im Well gehalten. Von den ermittelten Werten für die TER-Messung wurde der elektrische Widerstand eines unbehandelten Filters einer HTS 24-Transwell Filterplatte (im Mittel 45 $\Omega \times \text{cm}^2$) abgezogen. Der TER-Wert bezogen auf eine Fläche von 1 cm^2 wurde über folgende Formel errechnet:

$$\text{Gemessener Widerstand in } \Omega \times \text{Fläche der Filtermembran in } \text{cm}^2 = \text{TER-Wert in } \Omega \times \text{cm}^2$$

Für HTS 24-Transwell Filterplatten lautet die Formel:

$$\text{Gemessener Widerstand in } \Omega \times 0,33 = \text{TER-Wert in } \Omega \times \text{cm}^2$$

Die Zell-Linie MDCK (Madin Darby Canine Kidney, ATCC CCL-34), eine Epithelzell-Linie aus der Hundeniere, bildet einen dichten epithelialen Zell-Layer mit Werten von 2000-5000 $\Omega \times \text{cm}^2$ aus und diente als positive Kontrolle bei der Messung des Transepithelialen Elektrischen Widerstands.

2.14.3 Parazellulärer Transport von Natrium-Fluoreszein

Mono-Kulturen von NCI H441 bzw. NCI H820 und Ko-Kulturen von NCI H441 bzw. NCI H820 mit ISO-HAS-1 oder HPMEC an Tag 10 oder 11 in Kultur wurden für Transport-Studien eingesetzt. Zu diesem Zeitpunkt waren stabile maximale TER-Werte, als Maß für den Aufbau von *Tight Junctions* bei den Epithelzellen, erreicht. Der parazelluläre Fluss (= Transport entlang der Zell-Zell-Grenzen pro Zeiteinheit) von Natrium-Fluoreszein (MG 376.3 Da) wurde bei 37°C in apikal-basolateraler Richtung gemessen. Nach einer 2-stündigen Äquilibrierungsphase in Krebs-Ringer-Puffer (KRP; 1.1 mM MgCl₂*6H₂O, 1.25 mM CaCl₂*2H₂O, 114 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.65 mM Na₂HP0₄*7H₂O, 0.3 mM NaH₂P0₄*2H₂O, 10 mM HEPES, 20 mM NaHCO₃, und 25 mM Glukose, pH 7.4), wurden die Transportexperimente gestartet, indem der Puffer des oberen Wells (Donor, apikale Seite) durch 210 µl KRP mit Natrium-Fluoreszein (Konzentration 10 µg/ml) ersetzt wurde. Während des Experiments wurden regelmäßig die TER-Werte der Mono- und Ko-Kulturen gemessen, um die Integrität der Kulturen zu beurteilen. Im Verlaufe einer Zeitspanne von 3 h wurden alle 20 min Proben von 50 µl aus dem unteren Well (Akzeptor, basolaterale Seite) entnommen und jeweils durch ein gleiches Volumen frischen KRP ersetzt. Die Proben wurden in Wells einer 96 Well-Platte pipettiert, 1:5 mit 1 mM NaOH verdünnt und im Dunkeln aufbewahrt. Bei einem pH-Werte > 8 nach Zugabe von NaOH war die Fluoreszenz von Natrium-Fluoreszein stabil und unabhängig von pH-Wert-Änderungen. Die Messung der gesammelten Proben erfolgte gleichzeitig zu Versuchsende im Fluoreszenz-Reader bei einer Anregungs- und Emissions-Wellenlänge von 485 nm respektive 530 nm. Zur Auswertung wurde die kumulative Menge an Natrium-Fluoreszein im Akzeptorkompartiment als eine Funktion der Zeit graphisch aufgetragen. Die kumulative transportierte Menge stellt die Summe aus der zum Zeitpunkt x transportierten Menge und der bis zu diesem Zeitpunkt entnommenen Menge an Natrium-Fluoreszein dar. Der scheinbare (apparente) Permeabilitäts-Koeffizient wurde mittels folgender Formel berechnet:

$$P_{\text{app}} = (1/(A \cdot C_0)) \cdot (dQ/dt) \quad [\text{cm}/\text{sec}]$$

A = Filteroberfläche (0,33 cm²)

C₀ = Anfangskonzentration von Natrium-Fluoreszein in der Donor-Lösung (mg/cm³)

dQ/dt = Menge von Natrium-Fluoreszein, die pro Zeiteinheit durch den zellulären Layer transportiert wurde (parazellulärer Fluss, mg/sec)

2.15 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels ANOVA (analysis of variance). Bei Anwesenheit von signifikanten Unterschieden (F-Wert) wurde ein SNK (Student-Newman-Keuls) Test durchgeführt, um die Einzelwerte miteinander zu vergleichen. Dabei wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von p < 0,05 angenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Isolierung und Charakterisierung von humanen Alveoloarepithelzellen vom Typ II

3.1.1 Isolierung von ATII Zellen

Zur Isolierung humaner Alveoloarepithelzellen vom Typ II (hATII) wurde eine bereits in der Literatur beschriebene Methode (Murphy et al., 1999) mit der eigenen Isolierungsmethode, die zur Isolierung von mikrovaskulären Endothelzellen aus Lungengewebe etabliert wurde, verglichen (siehe Seite 43, Kap. Material und Methoden). Es wurde zunächst das Lungenparenchym nach enzymatischem Aufschluss untersucht um festzustellen, ob die Konzentration von Enzymen und die Dauer der Behandlung ausreicht, das Gewebe komplett zu verdauen. Dabei sollte eine möglichst große Zahl von Alveolarepithelzellen vom Typ II gleichzeitig mit mikrovaskulären Endothelzellen isoliert werden. Nach der enzymatischen Behandlung wurden immunhistochemische Präparate von den noch nicht verdauten Geweberesten (Restgewebe) angefertigt und die Isolation nach Murphy und Mitarbeitern mit der eigenen Methode verglichen. Bei der eigenen Isolationsmethode mit einem Gemisch aus Trypsin/EDTA (je 0,05%) und Elastase (10 U/ml) waren wenige Endothelzellen (Markierung mit CD31, Abb. 8A, rote Pfeile) und keine TTF-1 positiven Zellen (Abb. 8B) im Restgewebe nachweisbar. Insgesamt war bei der eigenen Präparation die Struktur des Parenchyms stärker aufgelöst als bei der Methode nach Murphy und Mitarbeitern. Bei letzterer war die Gewebestruktur teils noch erkennbar (Abb. 8C) und viele Zellen, besonders die mikrovaskulären Endothelzellen (Abb. 8C, rote Pfeile) und einige TTF-1 positive Zellen (hATII oder Clara-Zellen, Abb. 8D, roter Pfeil) verblieben im Restgewebe.

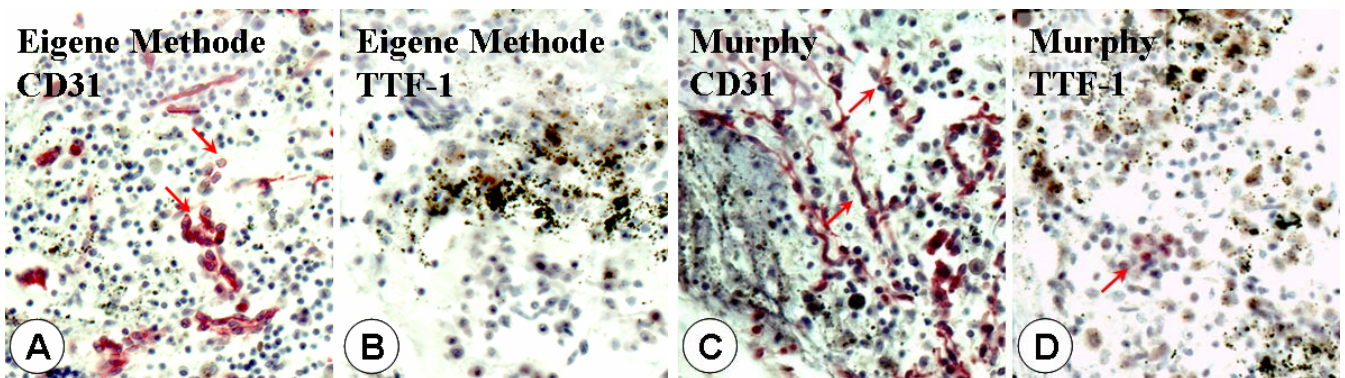


Abb. 8 Vergleich beider Isolationsmethoden durch den Nachweis von Markern für mikrovaskuläre Endothelzellen (CD31) und Alveolarepithelzellen (TTF-1) in den nicht verdauten Geweberesten. Immunhistochemie des Lungenrestgewebes nach eigener (A, B) und nach Isolationsmethode nach Murphy und Mitarbeitern (C, D). Indirekte Alkalische Phosphatase-Färbung (AP, rot, Pfeile) von CD31 (A und C) bzw. TTF-1 (B und D). Lichtmikroskopie, Vergrößerung 100x. Bei eigener Präparation wurde die Struktur der Mikrovaskulatur stärker aufgelöst und dadurch mehr HPMEC (A, CD31 positiv) aus dem Gewebe freigesetzt als im Vergleich zur Methode nach Murphy und Mitarbeitern (C). Die TTF-1 positiven Zellen (hATII Zellen und Clarazellen) wurden bei beiden Methoden ähnlich gut aus dem Gewebeverband herausgelöst.

Um die Ausbeute an humanen Alveoloarepithelzellen vom Typ II bei beiden Isolationsmethoden zu vergleichen, wurden die isolierten Zellen in P0 auf LabTek (8-Kammer-Glasobjektträger), die mit Kollagen Typ I beschichtete waren, ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert (3-5 Tage). Anschließend wurde an den kultivierten Zellen die Aktivität der endogenen Alkalischer Phosphatase (AP) bestimmt und die osmiophilen Lamellar Bodies mit Tanninsäure markiert. Mit beiden Isolationsmethoden wurden in P0 93-95% positive Zellen für AP und Lamellar Bodies nachgewiesen. Mit Hilfe der eigenen Isolationsmethode konnten sowohl humane pulmonale mikrovaskuläre Endothelzellen (HPMEC) als auch 93-95% hATII Zellen aus demselben Primärmaterial gewonnen werden, was mit der von Murphy und Mitarbeitern beschriebene Methode nicht gelang. Daher wurde die eigene Isolationsmethode ausgewählt, da mit ihr gleichzeitig die für die spätere Ko-Kultur notwendigen Zelltypen, HPMEC und hATII Zellen, isoliert werden konnten. Im Rahmen meiner Diplomarbeit wurden HPMEC bereits ausführlich charakterisiert (Hermanns, 1997), daher wurden die isolierten humanen Alveoloarepithelzellen vom Typ II im Folgenden weiter untersucht.

3.1.2 Phänotypische Charakterisierung der isolierten ATII Zellen

Die Reinheit der Zellen wurde direkt nach der Isolation durch den Nachweis der Aktivität von Alkalischer Phosphatase (AP-Kit, Sigma) in den Zellen bzw. den Nachweis hATII-relevanter Marker, wie TTF-1 und CD44v6, an Zytospins der isolierten Zellen (siehe Kap. 2.5.2) ermittelt. Die Anzahl an Makrophagen im Zytospin wurde über eine Markierung mit anti-CD68 bestimmt und machte 3-5% der Gesamtzellzahl im Zytospin aus (nicht gezeigt). Direkt nach Isolation zeigte nur ca. ein Viertel der Zellen eine Aktivität von Alkalischer Phosphatase (AP) im Zytospin (Abb. 9A und B). Dagegen waren 2/3 der Zellen im Zytospin positiv für die hATII-Marker CD44v6 und TTF-1 (Abb. 9A, C und D), wobei CD44v6 eine schwache Markierung zeigte (Abb. 9A). Demnach waren typische Merkmale von hATII Zellen, wie CD44v6, TTF-1 und AP, bei 1/4 der isolierten Zellen direkt nach der Isolation im Zytospin nachzuweisen. Im Vergleich zu Gewebeproben waren die Expression des Oberflächenantigens CD44v6 sowie die enzymatische Aktivität der Alkalischen Phosphatase im Zytospin schwächer, möglicherweise in Folge der enzymatischen Aufarbeitung der Zellen während der Isolationsschritte. Im Zytospin konnte in einer kleineren Population (< 5%) der isolierten Zellen TTF-1, ein Marker für hATII Zellen oder Clarazellen, und gleichzeitig Caveolin-1, das *in situ* bei hATII Zellen meist negativ und bei humanen Typ I Alveolarepithelzellen (hATI Zellen) stets positiv ist, nachgewiesen werden (Abb. 9 D). Da Alveolarepithelzellen vom Typ I nie eine nukleare Lokalisation von TTF-1 zeigen, wurden hier Caveolin-1 positive hATII Zellen oder Clarazellen detektiert.

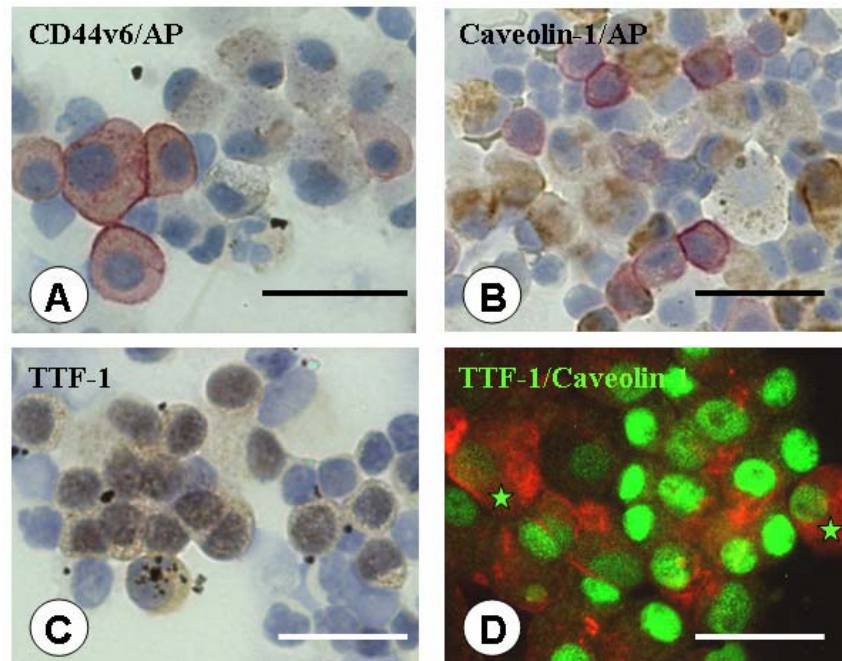


Abb. 9 Immunzytochemie und Immunfluoreszenz-Markierung an Zytospin der isolierten Zellen. Immunzytochemische DAB-Markierung (braun) mit anti-CD44v6 (A) bzw. anti-Caveolin-1 (B) und gleichzeitigem Nachweis der Aktivität der Alkalischen Phosphatase (AP) mittels Rotfärbung der positiven Zellen. DAB-Markierung (braun) mit anti-TTF-1 (C). Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung (D) von TTF-1 (grün) und Caveolin-1 (rot) mit TTF-1 und Caveolin-1 doppelt positiven Zellen (D, Sterne) im Zytospin. Größenmarkierung = 20 μm . Typische Merkmale von hATII Zellen, wie CD44v6, TTF-1 und AP waren bei 1/4 der isolierten Zellen direkt nach der Isolation im Zytospin nachweisbar.

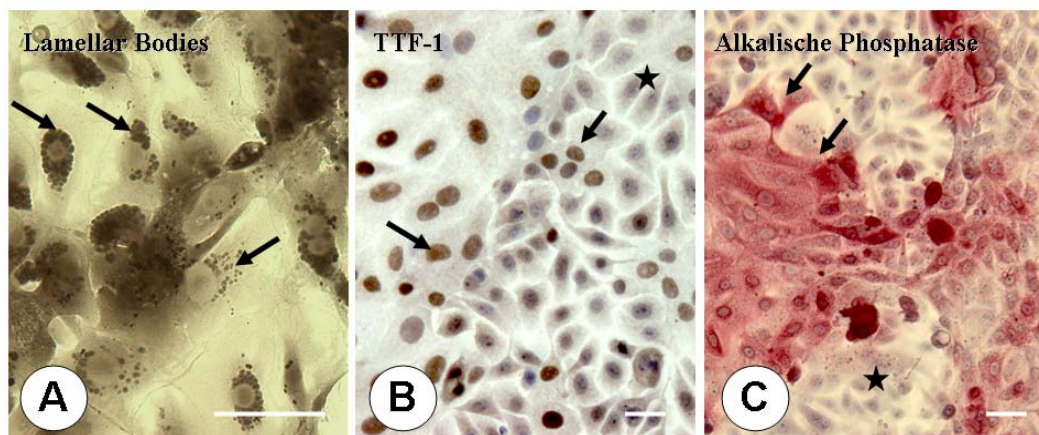


Abb. 10 Immunzytochemie und Nachweis der endogenen Alkalischen Phosphatase an den isolierten Zellen in P0. Die Zellen wurden in P0 auf Glasobjektträgern (LabTek) in AEGM kultiviert. Markierung der Lamellar Bodies nach Fixierung mit Osmiumtetroxid und Tanninsäure (A, Pfeile). Immunzytochemische DAB-Markierung (braun) mit anti-TTF-1 (B) und Nachweis der AP mittels Rotfärbung der positiven Zellen (C). Kerngegenfärbung blau, Größenmarkierung = 20 μm . 93-95% der Zellen einer konfluenten P0 besaßen Lamellar Bodies (A). Nach 3-5 Tagen in Kultur wurde TTF-1 nur noch bei einigen Zellen stark (B, Pfeil), bei anderen eher schwach nukleär markiert (B, Stern) und nur etwa die Hälfte der isolierten Zellen zeigte eine deutliche (C, Pfeile), die restlichen eine schwache (C, Stern) bis fehlende Alkalische-Phosphatase-Aktivität.

Da hATII Zellen in Kultur innerhalb weniger Tage dedifferenzieren bzw. zu Typ I-ähnlichen Zellen transdifferenzieren, wurden die isolierten Zellen direkt auf Kollagen Typ 1-beschichtete LabTek ausgesät und nach 3-5 Tagen in P0 charakterisiert. Sofern nicht anders angegeben, erfolgte die Charakterisierung in serumfreiem AEGM. Die primäre Mono-Kultur (P0) der isolierten hATII Zellen auf Gewebekulturplastik zeigte phasenkontrastmikroskopisch kuboidale Epithelzellen, selten wurden einzelne Zellen mit spindelförmig bi- bis multipolarer Ausrichtung beobachtet (Abb. 21, Seite 79). Nach Markierung mit Osmiumtetroxid und Tanninsäure wurden Lamellar Bodies als braune Zelleinschlüsse bei ca. 93-95% der Zellen einer konfluenten P0 nachgewiesen (Abb. 10A, Pfeile). Das Epithelzellisolat enthielt auch nach 5 Tagen in Kultur 93-95% ATII Zellen. Innerhalb dieses Kultivierungszeitraums war jedoch in serumfreiem AEGM bereits eine Abnahme der Expression von TTF-1 und der Aktivität der Alkalischen Phosphatase zu beobachten. So fiel die positive nukleäre Markierung von TTF-1 unterschiedlich stark aus (Abb. 10B), und nur etwa die Hälfte der isolierten Zellen zeigte eine deutliche (Abb. 10C, Pfeile), die restlichen eine schwache (Abb. 10C, Stern) bis fehlende Aktivität der Alkalischen Phosphatase.

Tabelle 9 fasst alle untersuchten Marker für Alveoloarepithelzellen vom Typ II im Vergleich zu der Zell-Linie A549 zusammen.

Tab. 9: Charakterisierung der isolierten Zellen in P0 im Vergleich zu A549, anhand von Markern für ATII Zellen

Marker	Zelltyp	
	Epithelzellisolat	A549
Lamellar Bodies	+++	+++
Alkal. Phosph.	+	±
SP-A	++	++
SP-B	+	+
SP-C/proSP-C	+ bzw. ± ¹⁾	++ bzw. ++ ¹⁾
SP-D	++	++
TTF-1	++	-
CD44v6	± bzw. ++ ³⁾	+
CK 8	+	+
CK 18	±	++
CK 19	++	-
E-Cadherin	+	±
ZO-1	+	± bzw. + ²⁾

Nachweis mittels Immunfluoreszenz (IF) und ¹⁾ Western blot, ²⁾ PCR, n.b. = nicht bestimmt, ³⁾ zwei verschiedene Populationen von Zellen, - bezeichnet keine, ± eine vereinzelte, + eine schwache und ++ eine starke Markierung mit Fluorochrom

Zytokeratin CK 19 wurde deutlich markiert, während CK 18 bei hATII Zellen in P0 nur schwach erschien. Im Vergleich dazu zeigten A549 kein CK 19 und eine deutliche Lokalisation von CK 18 im Zytoskelett. SP-C und sein Vorläufer proSP-C, beides eindeutig ATII-spezifische Marker, konnten in P0 bei 95% der isolierten Zellen mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. Im Western-Blot war das 16 kDa Prozessierungsprodukt des hydrophoben proSP-C direkt nach der Isolation jedoch nur schwach nachzuweisen, während die Zell-Linie A549 und ein Lysat aus Lungengewebe (Lungenlysat) eine deutliche Bande zeigten (Abb. 11).

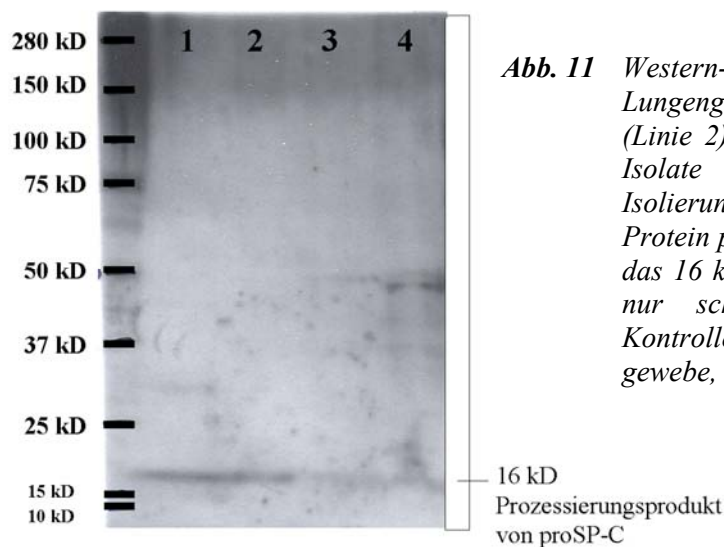


Abb. 11 Western-Blot für proSP-C an einem Lysat aus Lungengewebe (Linie 1) und der Zell-Linie A549 (Linie 2) als positive Kontrollen sowie für zwei Isolate von hATII Zellen direkt nach der Isolierung (Linie 3 und 4). Einsatz von 8 µg Protein pro Probe. Direkt nach der Isolation war das 16 kDa Prozessierungsprodukt von proSP-C nur schwach nachzuweisen, während die Kontrollen, A549 und ein Lysat aus Lungengewebe, eine deutliche Bande zeigten.

Da Marker wie TTF-1 und die Surfactant Proteine SP-A, SP-B und SP-D auch bei bronchialen Clarazellen vorkommen, sollten kontaminierende Clarazellen im Isolat über das für Clarazellen spezifische Protein CC-10 mittels Immunfluoreszenz und RT-PCR nachgewiesen werden. Ebenfalls wurde das Vorkommen von Caveolin-1 bzw. CK14, deren Markierung *in situ* bei hATI Zellen bzw. bei basalen Bronchialzellen beschrieben ist, mittels Immunfluoreszenz untersucht. Die Ergebnisse der Untersuchungen werden in Tabelle 10 zusammengestellt.

Tab. 10: Charakterisierung der isolierten Zellen in P0 im Vergleich zu A549 anhand von Markern für ATI Zellen, Clarazellen und Basalzellen *in situ*

Marker	Zelltyp	
	Epithelzellisolat	A549
Caveolin-1	± bzw. ++ ³⁾	+ bzw. + ¹⁾
CC-10	- bzw. + ²⁾	- ²⁾
MVB ^{*)}	-	+
CK14	- bzw. + ³⁾	-

Nachweis mittels Immunfluoreszenz (IF) und ¹⁾ Western blot, ²⁾ PCR, ³⁾ zwei verschiedene Populationen von Zellen; - bezeichnet keine, ± eine vereinzelte, + eine schwache und ++ eine starke Markierung mit Fluorochrom; ^{*)} MVB = multivesikuläre bodies

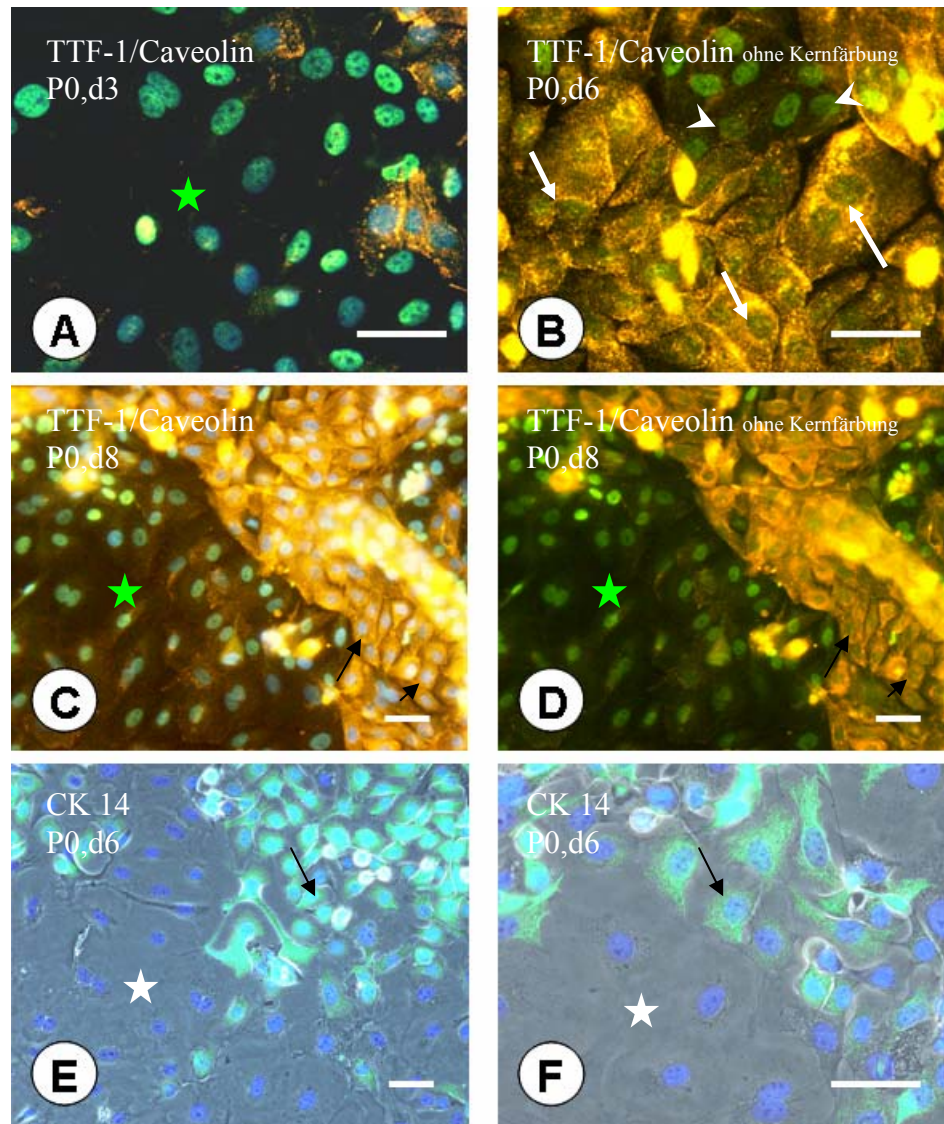


Abb. 12 Expression von Caveolin-1, CK14 und TTF-1 an morphologisch unterschiedlichen Zellpopulationen der isolierten Zellen in P0. Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung von TTF-1 (grün) und Caveolin-1 (rotorange wegen Überlagerung von rot und grün) in P0 nach 3d (A), 6d (B) und 8d (C und D). Kerngegenfärbung blau (Hoechst 33342), Größenmarkierung = 20 μ m. In P0 traten zwei Populationen von Zellen auf, die eine mit abgeflachtem (Sterne) die andere mit kuboidalem morphologischen Phänotyp (schwarze Pfeile). An Tag 3 kamen überwiegend flach ausgebreitete TTF-1 positive Zellen vor (A, Stern). Die stark TTF-1 positiven Zellen zeigten an Tag 6 und 8 eine schwache Markierung mit Caveolin-1 (B, Pfeilköpfe). Nach 6-8 Tagen in Kultur waren vermehrt Areale kuboidaler Zellen nachweisbar, die für Caveolin-1 stark und für TTF-1 schwach positiv waren (B, weisse Pfeile, C und D schwarzer Pfeil). Die Überlagerung der Immunfluoreszenz-Markierung von CK14 (grün) mit einer Phasenkontrastaufnahme zeigt für CK14 positive kuboidale Zellen (E und Vergrößerung F, schwarze Pfeile) während die flachen Zellen CK 14 negativ waren (E und F, Stern).

In P0 waren zwei Zellpopulationen mit unterschiedlich starker Expression von Caveolin-1 nachweisbar, man fand abgeflachte Zellen mit fehlender bis schwacher und kuboidale Zellen mit starker Expression von Caveolin-1 (Abb. 12A-D). Der Nachweis von TTF-1 verhielt sich in beiden Populationen umgekehrt, die flach ausgebreiteten Zellen exprimierten TTF-1 meist stark, während TTF-1 in den kuboidalen Zellen nukleär schwach exprimiert war (Abb. 12B). Über einen Zeitraum

von 3-8 Tagen in serumfreiem AEGM waren vermehrt kuboidale Zellen in den Kulturen nachweisbar (Abb. 12A-D). Ein weiterer Unterschied zwischen beiden oben beschriebenen Zellpopulationen lag in der Expression von CK-14. CK14 war in der flach ausgebreiteten Zellpopulation eindeutig negativ, während die kuboidalen Zellen alle deutlich CK14 positiv waren (Abb. 12E und F). Beide Populationen waren mittels Immunfluoreszenz negativ für den Clarazell-Marker CC-10.

3.2 Untersuchung der Kulturbedingungen für primär isolierte Zellen (HPMEC, hATII)

3.2.1 Charakterisierung von hATII Zellen in Abhängigkeit vom Serumgehalt

Fuchs und Mitarbeiter (Fuchs et al., 2003) beobachteten bei kultivierten hATII Zellen eine Transdifferenzierung zu Typ I-ähnlichen Zellen innerhalb weniger Tage in P0 auf Filtermembranen. Diese ging mit einem Verlust der Expression von proSP-C innerhalb von 8 Tagen in Kultur einher. Als Kulturmedium wurde von Fuchs und Mitarbeitern SAGM (*Small Airway Epithelial Cell Growth Medium*) mit einem Zusatz von 1% FKS eingesetzt. Um die von Fuchs und Mitarbeitern beschriebene Transdifferenzierung an den eigenen Isolaten zu überprüfen, wurden die Zellen in P0 auf LabTek in SAGM mit 1% FKS ausgesät und nach 3, 5, 7 und 9 Tagen fixiert. Parallel dazu wurde dasselbe Isolat zur Erhaltung des hATII-Phänotyps in serumfreiem AEGM (*Airway Epithelial Cell Growth Medium*) kultiviert und zu den gleichen Zeitpunkten fixiert. Um die Differenzierung der Zellen zu untersuchen wurden zwei für hATII Zellen spezifische Marker, TTF-1 und proSP-C mit Hilfe einer indirekten Doppelimmunfluoreszenz nachgewiesen.

Am Tag 3 der Kultivierung waren unabhängig vom Medium nur ca. 1/3 der Zellen positiv für TTF-1. Demgegenüber zeigten alle Zellen eine intensive perinukleäre Markierung für proSP-C, die von einer schwachen retikulären Markierung (Bereich des Golgi-Apparates und des ER) innerhalb des Zytoplasmas begleitet wurde (Abb. 13A-E). Im Verlaufe der Kultivierung wurde der Einfluss der Medien auf die Zellgestalt und die Expression der beiden ATII-Marker deutlicher. Während der Kultivierung in SAGM mit 1% FKS entwickelte sich ab Tag 5 ein morphologisch homogener Phänotyp abgeflachter Zellen, die überwiegend TTF-1 positiv waren (Abb. 13F-H). In serumfreiem AEGM waren zwei Populationen von Zellen zu beobachten, flach ausgebreitete Zellen mit intensiver nukleärer Markierung für TTF-1 (Abb. 13B und C, Stern) und kleinere kuboidale Zellen mit schwächerer TTF-1 Markierung (Abb. 13B und C, Pfeilspitze). Im Laufe der Kultivierung kam es zu einer Verschiebung des Expressionsmusters für proSP-C in AEGM mit einer Abnahme der retikulären und Zunahme der perinukleären Expression von proSP-C (Abb. 13B-D). An Tag 9 der P0 in serumfreiem AEGM wurde bei 50-60% der kuboidalen Zellen proSP-C intensiv perinukleär exprimiert (Abb. 13D), eine nukleäre Expression von TTF-1 war jedoch nur bei wenigen Zellen nachweisbar. Demgegenüber waren die flach ausgebreiteten Zellen in SAGM mit 1% FKS überwiegend positiv für TTF-1 und zeigten eine schwache retikuläre Expression von proSP-C an Tag 9 (Abb. 13H).

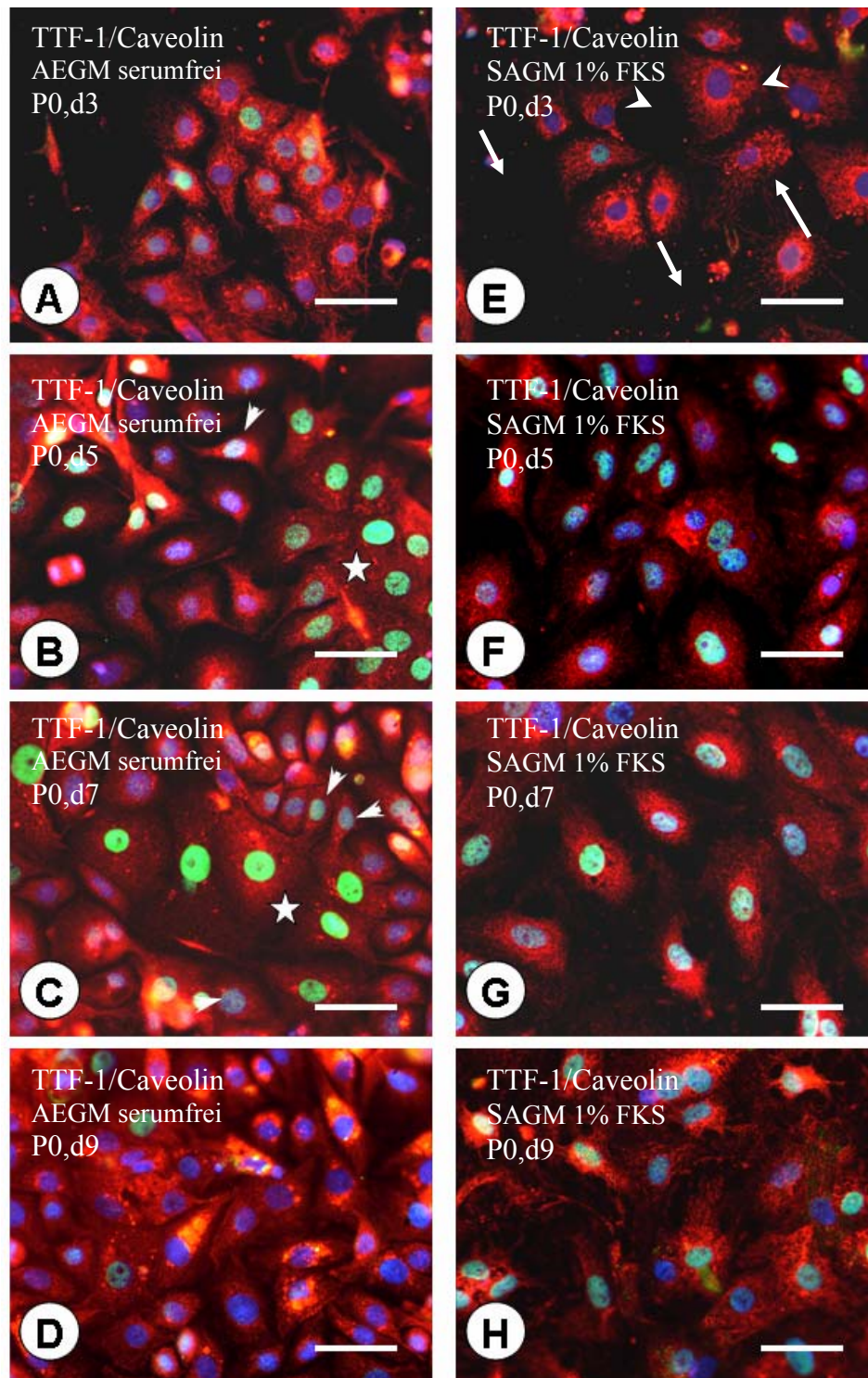


Abb. 13 Nachweis von *hATII*-spezifischen Markern (*proSP-C* und *TTF-1*) an den isolierten Zellen, die in P0 in serumfreiem bzw. serumhaltigem Medium kultiviert wurden. Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung von *TTF-1* (grün) und *proSP-C* (rot) für eine P0 in AEGM an Tag 3 (A), Tag 5 (B), Tag 7 (C) und Tag 9 (D) bzw. in SAGM mit 1% FKS an d3 (E), d5 (F), d7 (G) und d9 (H). Kerngegenfärbung blau, Größenmarkierung = 20 μ m. In serumfreiem AEGM waren zwei Populationen von Zellen zu beobachten, flach ausgebreitete Zellen mit intensiver nukleärer Markierung für *TTF-1* (B und C, Stern) und kleinere kuboidale Zellen mit schwächerer *TTF-1* Markierung (B und C, Pfeilspitze). Alle Zellen zeigten eine intensive perinukleäre Markierung für *proSP-C*, wobei die *TTF-1*-Expression stark abnahm (A-D). In serumhaltigem SAGM wurde *proSP-C* schwach und eher retikulär (Bereich des Golgi-Apparates und des ER) exprimiert. Eine nukleäre *TTF-1*-Expression war in SAGM bis zum Tag 9 bei den meisten Zellen nachweisbar (H).

Die in SAGM mit 1% FKS kultivierten Zellen waren bis zu Tag 9 positiv für TTF-1, während die Expression von proSP-C an Tag 9 gegenüber Tag 3 deutlich verringert war (Abb.13E und H). Demgegenüber zeigten die in serumfreiem AEGM kultivierten Zellen innerhalb von 9 Tagen in Kultur eine größtenteils fehlende Expression von TTF-1. Dagegen konnten weiterhin mit proSP-C gefüllte perinukleäre Einschlüsse nachgewiesen werden. Die höhere Zellzahl (Anzahl Kerne/Bildausschnitt) in AEGM gegenüber SAGM mit 1% FKS wies auf eine höhere Proliferationsrate der Zellen in serumfreiem AEGM hin. Diese Beobachtung wurde durch einen späteren Nachweis des Proliferationsmarkers Ki67 (siehe Kap. 3.2.4) bestätigt.

3.2.2 Wachstumsverhalten von hATII in serumfreien synthetischen Kulturmedien

Da Serumzusätze die Transdifferenzierung von ATII zu Typ I-ähnlichen Zellen begünstigen (Kawada et al., 1990; Paine et al., 1990; Borok et al., 1995), wurden verschiedene serumfreie Medien untersucht, die eine Beibehaltung des ATII-Phänotyp begünstigen sollten. Xu und Mitarbeiter (Xu et al., 1998) beschrieben ein serumfreies Medium mit Insulin, Transferrin, BSA, Selen- und Linolensäure (ITS⁺, 1:20), EGF (epidermal growth factor, 10 ng/ml) und BSA (50 µg/ml) als Zusätze. Desweiteren konnte durch den Einsatz eines kommerziell erhältlichen synthetischen Mediums ohne Serumzusätze der ATII Phänotyp der Maus bis zu 7 Tagen in Kultur erhalten werden (Rice et al., 2002). Aufgrund dieser Befunde wurde mit Hilfe von Langzeitkulturen das Proliferationsverhalten der hATII Zellen in Mono-Kultur in verschiedenen Medien vergleichend analysiert.

Abbildung 14 zeigt die Entwicklung der Zellzahl der isolierten Zellen in P2 in den entsprechenden serumfreien Medien: SAGM, AEGM und M199 mit ITS⁺ (Insulin, Transferrin und Selensäure, 1:20), EGF (epidermal growth factor, 10 ng/ml) und BSA (50 µg/ml) als Zusätze und M199 ohne Zusätze.

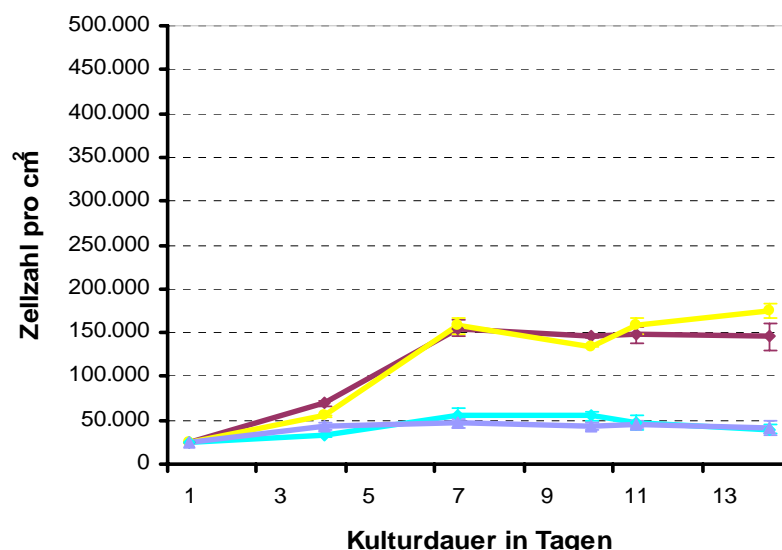


Abb. 14 Proliferationskurve der isolierten Zellen (P2) in verschiedenen serumfreien Medien. Entwicklung der Zellzahl im Verlauf der Kultur (P2) in serumfreiem SAGM (■—■), AEGM (◆—◆) und M199 mit ITS⁺ (1:20), EGF (10 ng/ml) und BSA (50 µg/ml) (◆—◆) bzw. ohne Zusätze (▲—▲), Vorkultur in serumfreiem SAGM. Serumfreies SAGM und AEGM unterstützten die Proliferation der Zellen während M199 ohne und mit Zusätzen die Proliferation der Zellen nur gering induzieren konnte.

Nach 7 Tagen in SAGM und AEGM wurde eine maximale Zellzahl von $1,65 \times 10^5$ Zellen/cm² erreicht, die im weiteren Verlauf in AEGM bis zum Tag 14 auf einem Plateau blieb. Demgegenüber stieg die Zellzahl in SAGM leicht bis zu $1,9 \times 10^5$ Zellen/cm² am Tag 14 an. In M199 nahm die Zellzahl unabhängig von den Zusätzen nur leicht von anfangs 2×10^4 Zellen/cm² auf $4,5 \times 10^4$ Zellen/cm² am Tag 7 bis 10 zu, während diese anschließend bis Tag 14 wieder leicht abnahm. M199 mit und ohne Zusätze konnte die Proliferation der Zellen nur gering induzieren. Dagegen betrug die Populations-Verdopplungszeit für die isolierten Zellen innerhalb der ersten Tage bis zur Konfluenz in SAGM sowie AEGM ca. 45-48 h.

Da beide synthetischen Medien SAGM und AEGM die Proliferation der isolierten Zellen auf Gewebekulturplastik förderten und beide sich nur in einer Komponente, dem Zusatz von BSA zu SAGM, unterschieden, wurde zur Beurteilung der Differenzierung eine Charakterisierung der isolierten Zellen in AEGM als Kulturmedium durchgeführt.

3.2.3 Charakterisierung der hATII* Zellen im Verlaufe der Passagen

Wegen ihrer raschen De- bzw. Transdifferenzierung in serumhaltigem Medium wurden ATII Zellen in bisher beschriebenen Kulturmodellen meist in P0 für Versuche verwendet (Rice et al., 2002). Da für die spätere Ko-Kultur und die vergleichenden Untersuchungen mit den Zell-Linien viele Zellen gebraucht wurden, sollte geprüft werden, ob sich die in serumfreiem Medium kultivierten Zellen passagieren ließen und phänotypische Merkmale von hATII Zellen beibehielten.

Nach dem Passagieren mit Trypsin wurde auch in eigenen Versuchen der größte Teil der in serumfreiem AEGM kultivierten hATII Zellen nicht mehr adhärent. Durch das Verwenden eines schonenderen Enzymgemischs, Collagenase I/EDTA, konnten die isolierten Zellen nach 4-5 Tagen in Kultur leicht abgelöst werden, wurden adhärent und konnten so mehrere Passagen weiter kultiviert werden. Da das Passagieren das Wachstum bestimmter Subpopulationen der hATII Zellen oder auch das Wachstum kontaminierender Zelltypen begünstigen könnte, werden die passagierten Zellen im Folgenden als hATII* mit Angabe der entsprechenden Passage bezeichnet (z.B. hATII* P1 bedeutet passagierte hATII-Isolate in erster Passage). An den passagierten hATII* wurden hATII-spezifische Marker im Verlaufe der Passagen mittels Immunfluoreszenz untersucht.

Eine Immunfluoreszenz-Markierung mit anti-SP-A und anti-SP-D konnte an den in serumfreiem AEGM kultivierten hATII* bis zur P6 (43-45 Tage alt) gezeigt werden, wobei die Expression von SP-B und SP-C bereits in P2 (ca. 18 Tage alt) deutlich abnahm. Abbildung 15 zeigt die Immunfluoreszenzfärbung der Surfactant-Proteine an 6 Tage alten hATII Zellen in P0 und an passagierten hATII* in P1 (10 Tage alt) und P2 (18 Tage alt). Die Expression von SP-D (Abb. 15 J-L) war bei allen Zellen deutlich positiv, während die übrigen Surfactant-Proteine je nach Zelle unterschiedlich stark produziert wurden. SP-A (Abb. 15A-C) war bei fast allen Zellen punktiert über das gesamte Zytoplasma verteilt nachweisbar. Von P0 bis P2 nahm die Anzahl der punktförmigen Expression leicht ab (Abb. 15A-C). SP-B war meist in größeren, flach ausgebreitet erscheinenden Zellen lokalisiert, während die kleineren kuboidalen Zellen kaum SP-B zeigten (Abb. 15D, E). In P2

war kaum noch eine Zelle positiv für SP-B (Abb. 15F). Alle Zellen waren schwach positiv für SP-C, dabei nahm die Anzahl punktförmigen Expression von SP-C im Zytoplasma von der P0 bis zur P2 deutlich ab (Abb. 15G-I).

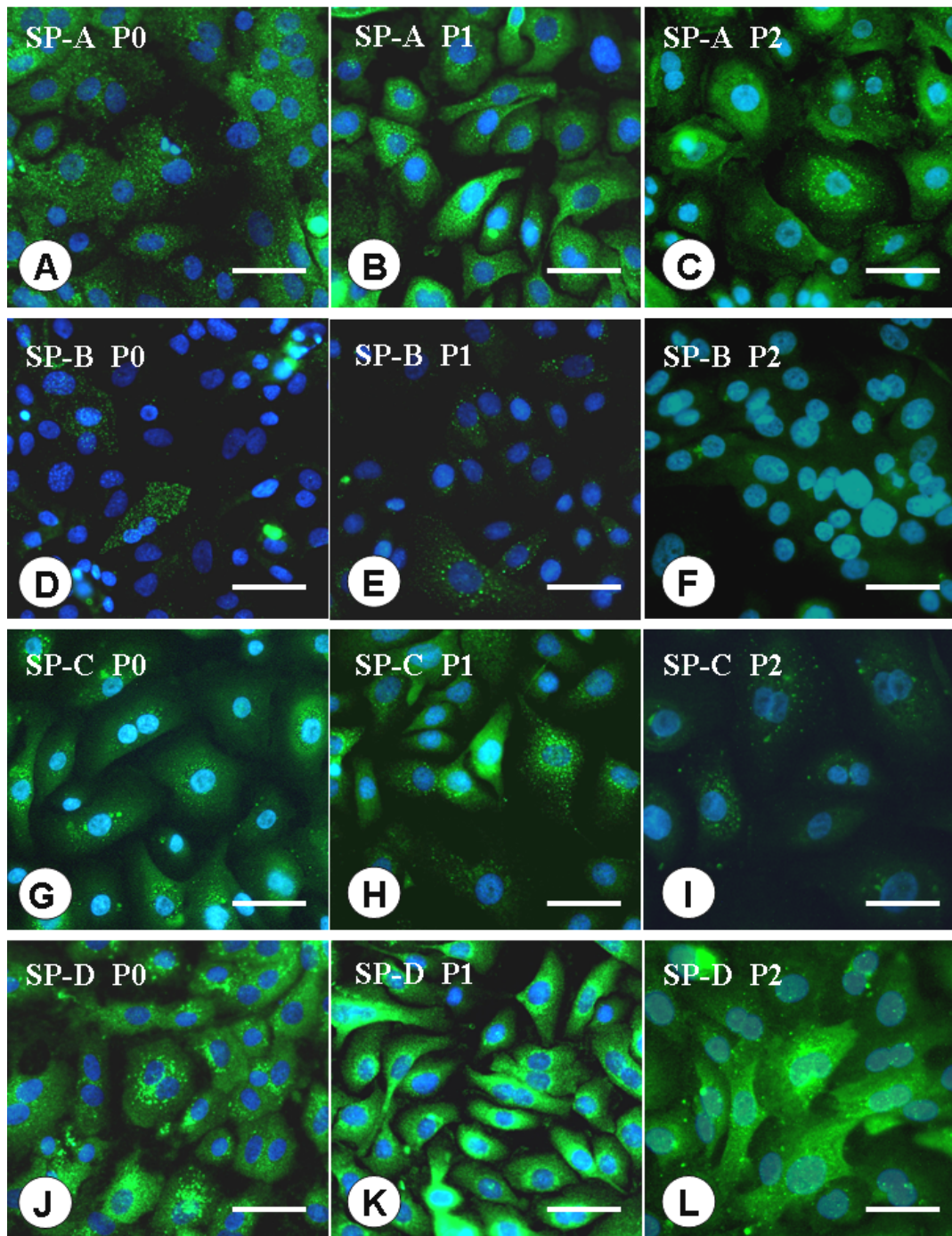


Abb. 15 Nachweis von hATII-spezifischen Markern (SP-A, SP-B, SP-C und SP-D) an isolierten Zellen, die von P0 bis P2 in serumfreiem Medium (AEGM) kultiviert wurden. Immunfluoreszenz-Markierung (grün) von SP-A (A-C), SP-B (D-F), SP-C (G-I) und SP-D (J-L) der isolierten hATII Zellen in P0 nach 6d in Kultur (A, D, G, J) und hATII* in erster Passage (P1, 10d alt) (B, E, H, K) und in zweiter Passage (P2, 18d alt) (C, F, I, L) in serumfreiem AEGM. Kerngegenfärbung blau, Größenmarkierung = 20 μ m. Bis zur P2 konnte eine gleichbleibende Expression von SP-A und SP-D gezeigt werden. Die Expression von SP-B und SP-C nahm bereits in P2 (ca. 18 Tage alte Kultur) deutlich ab.

Korrelierend zu einer schwächer werdenden Expression von SP-B und SP-C, deren Produktion über den nukleären Transkriptionsfaktor TTF-1 gesteuert wird, war die nukleäre Expression von TTF-1 in P1 schwach und bereits in P3 immunzytochemisch nicht mehr nachweisbar (Abb. 16A-C).

Die Lokalisation der *Tight Junction*- und *Adherens Junction*-assoziierten Proteine ZO-1 (Abb. 16D-F) und E-Cadherin (Abb. 17A-C) an den Zell-Zell-Grenzen nahm bei der Kultivierung in serumfreiem AEGM von P0 bis P3 deutlich ab. So war ZO-1 (Abb. 16F) und E-Cadherin (Abb. 17C) bei den hATII* in dritter Passage (P3) nach 27 Tagen in Primärkultur nur noch partiell nachweisbar.

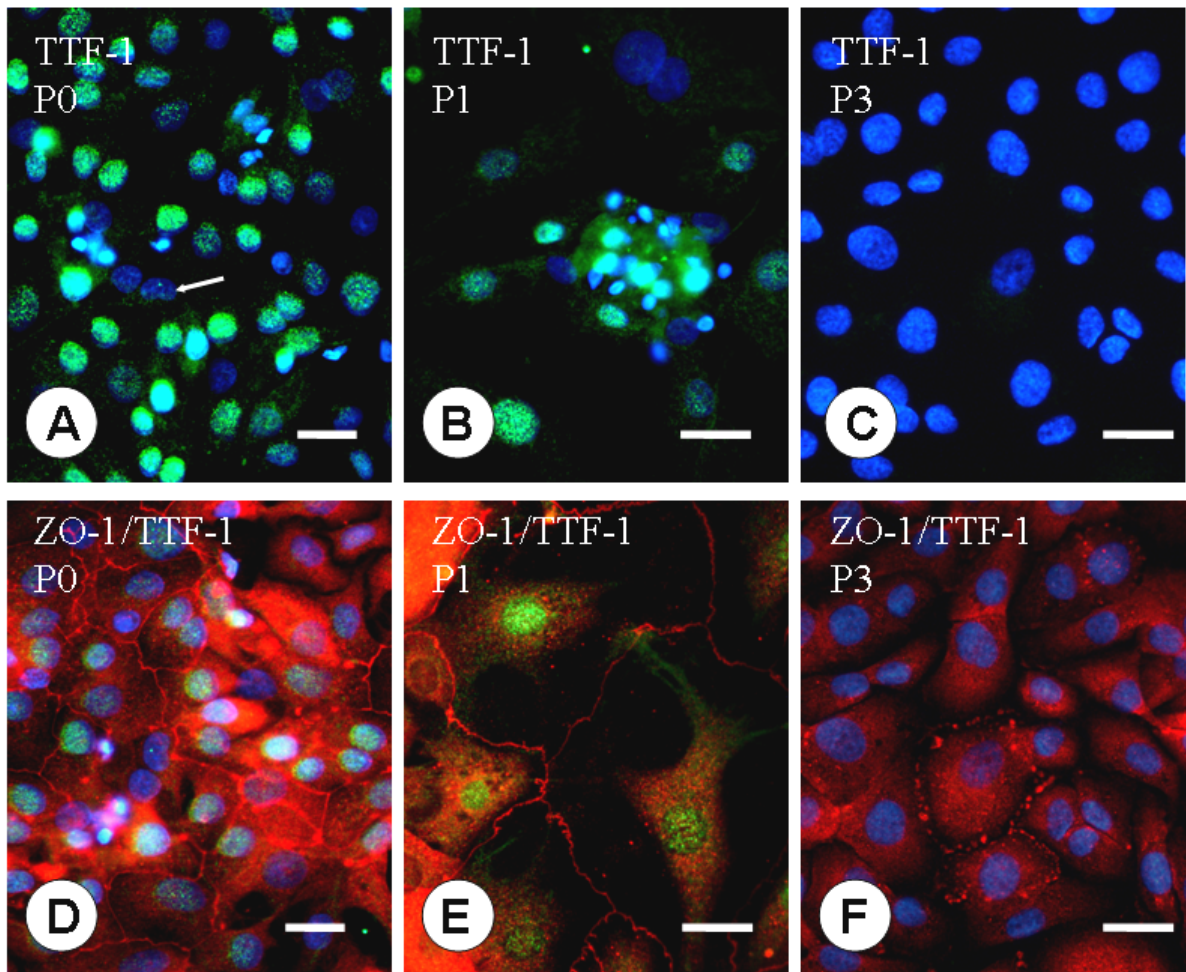


Abb. 16 Nachweis von hATII-spezifischen Markern (TTF-1 und ZO-1) an isolierten Zellen, die von P0 bis P3 in serumfreiem Medium (AEGM) kultiviert wurden. Immunfluoreszenz-Markierung von TTF-1 (grün) bzw. Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung von TTF-1 (grün) und ZO-1 (rot) an hATII Zellen in P0 nach 6d in Kultur (A bzw. D), hATII* in erster Passage (P1, 10d alt) (B bzw. E) und hATII* in dritter Passage (P3, 27d alt) (C bzw. F) in serumfreiem AEGM. Kerngegenfärbung blau, Größenmarkierung = 20 μ m. Die nukleäre Expression von TTF-1 war immunzytochemisch in P1 schwach und in P3 nicht mehr nachweisbar (A-C). Von P0 bis P3 nahm die Markierung des Tight Junction Proteins ZO-1 an den Zell-Zell-Grenzen deutlich ab und war zunehmend im Zytoplasma lokalisiert.

Während in P0 nur eine Subpopulation kleinerer, kuboidaler Zellen für Caveolin-1 positiv war (Abb. 17D), nahm im Verlaufe der Passagen die Expression von Caveolin-1 zu und war auf allen Zellen gleichmäßig verteilt nachweisbar (Abb. 17F).

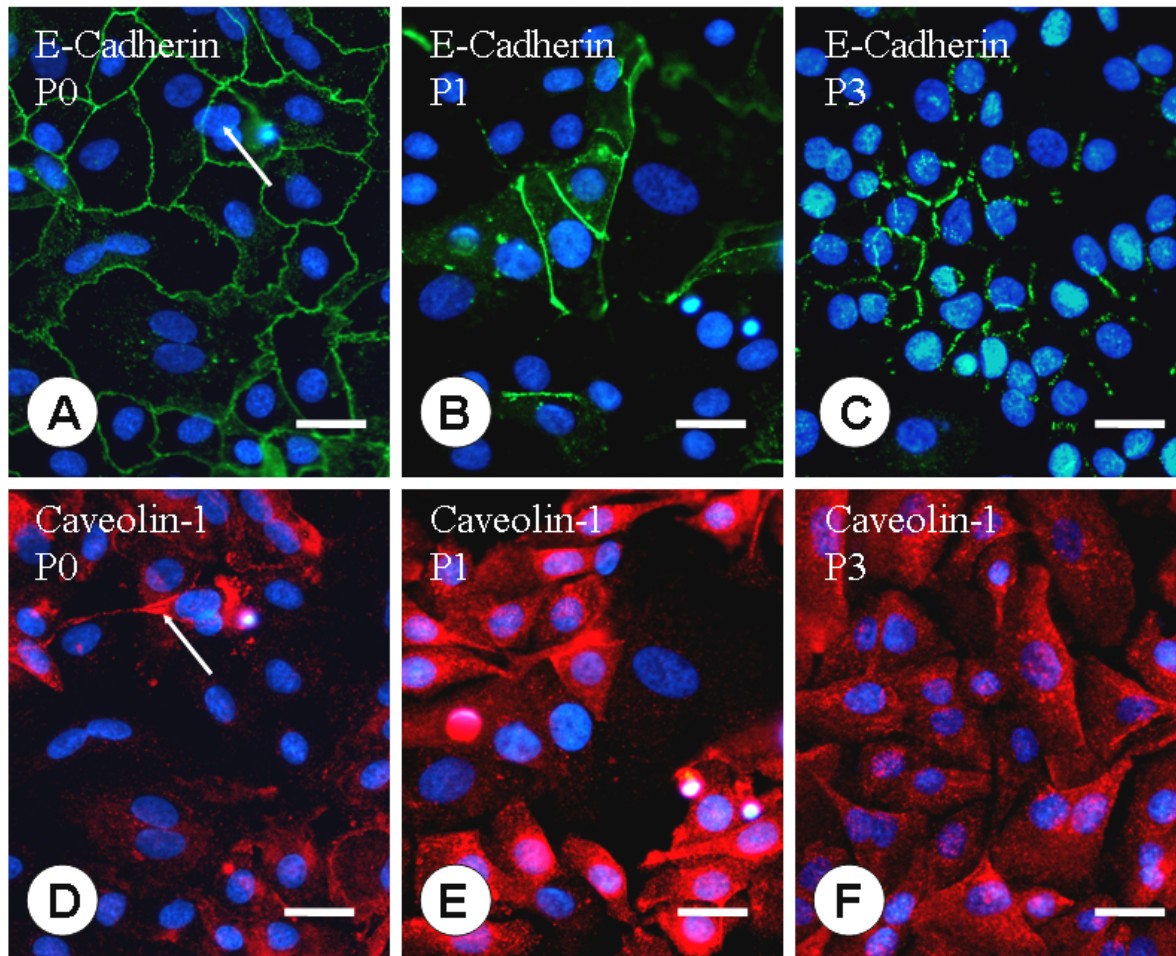


Abb. 17 Nachweis des epithelspezifischen Markers *E-Cadherin* und von *Caveolin-1* an *hATII* Zellen im Verlaufe der Passagen in serumfreiem Medium (AEGM). Immunfluoreszenz-Markierung von *E-Cadherin* (grün) bzw. *Caveolin-1* (rot) an *hATII* in P0 nach 6d in Kultur (A bzw. D), *hATII** in erster Passage (P1, 10d alt) (B bzw. E) und *hATII** in dritter Passage (P3, 27d alt) (C bzw. F) in serumfreiem AEGM. Kerngegenfärbung blau, Größenmarkierung = 20 μm . Von P0 bis P3 nahm die kontinuierliche Markierung des Adherens Junction Proteins *E-Cadherin* an den Zell-Zell-Grenzen deutlich ab. In P0 war eine Subpopulation kleinerer, kuboidaler Zellen für *Caveolin-1* positiv. Vereinzelt wurden *E-Cadherin* negative (A, Pfeil) und *Caveolin-1* positive fibroblastoide Zellen gefunden (D, Pfeil). Die Expression von *Caveolin-1* nahm im Verlaufe der Passagen zu und war in P3 bei allen Epithelzellen nachweisbar.

Der Nachweis von Markern nicht-epithelialer Zellen, wie Vimentin für Fibroblasten und Endothelzellen und smAktin für glatte Muskelzellen bzw. Myofibroblasten, zeigte in P0 nur vereinzelt positive Zellen (gezeigt in P1 für Vimentin Abb. 21C, Seite 79). In P0 traten vereinzelt Zellen mit langgestrecktem Zellkern und spindelförmig bi- bis multipolarer Ausrichtung auf, die positiv für *Caveolin-1* waren, jedoch das epitheliale Cadherin, *E-Cadherin*, nicht exprimierten (Abb.17A und D, Pfeile). Bei diesen nicht-epithelialen Zellen, die oberhalb des Epithellayers wuchsen, handelte es sich vermutlich um Fibroblasten, für die eine Expression von *Caveolin-1* beschrieben ist. Diese in P0 selten vorkommenden, langgestreckten Zellen erwiesen sich bei der weiteren Passage und bei der Ko-Kultur mit Endothelzellen als störend, da sie auf Membranfiltern ein vermehrtes Wachstum zeigten und dadurch die Ausbildung eines dichten epithelialen Layers verhinderten. Folglich musste eine

Möglichkeit gefunden werden, die Reinheit der Alveolarepithelzellen vom Typ II im Isolat zu erhöhen. Dies erfolgte über eine magnetische Separation mit anti-CD44v6-gekoppelten Magnetbeads.

3.2.4 Isolierung der CD44v6 positiven Zellen

In Primärisolaten der hATII Zellen traten wie bereits gezeigt langgestreckte Zellen, vermutlich Fibroblasten, in geringer Anzahl auf. Diese Zellen proliferierten in P0 wenig, zeigten jedoch bei der weiteren Kultivierung nach Passagieren, besonders bei der Ko-Kultivierung der passagierten Isolate mit Endothelzellen (siehe Kap. 3.11), ein vermehrtes Wachstum. Um die Ausbildung eines dichten epithelialen Layers für die spätere Ko-Kultur mit Endothelzellen zu gewährleisten, war es notwendig, eine Reinkultur von hATII Zellen zu erhalten. Dazu wurde die Methode der positiven Separation der hATII Zellen mit Hilfe immunomagnetischer Partikel verwendet. Als spezifische membrangebundene antigene Determinante der hATII Zellen wurde CD44v6 ausgewählt.

Um die Spezifität des eingesetzten Antikörpers für CD44v6 festzustellen, wurde dessen Markierung an Paraffinschnitten von humanem Lungengewebe immunzytochemisch untersucht. Wie Abb. 18 zeigt, markiert der MoAK CD44v6 (Neo Marker, Klon VFF-7) in gesundem Lungengewebe *in situ* spezifisch Basalzellen der Bronchien und Bronchiolen (Abb. 18A) bzw. Alveolarepithelzellen vom Typ II (Abb. 18B und in Vergrößerung 18C). Die Endothelzellen sind mit anti-CD31 schwarz markiert.

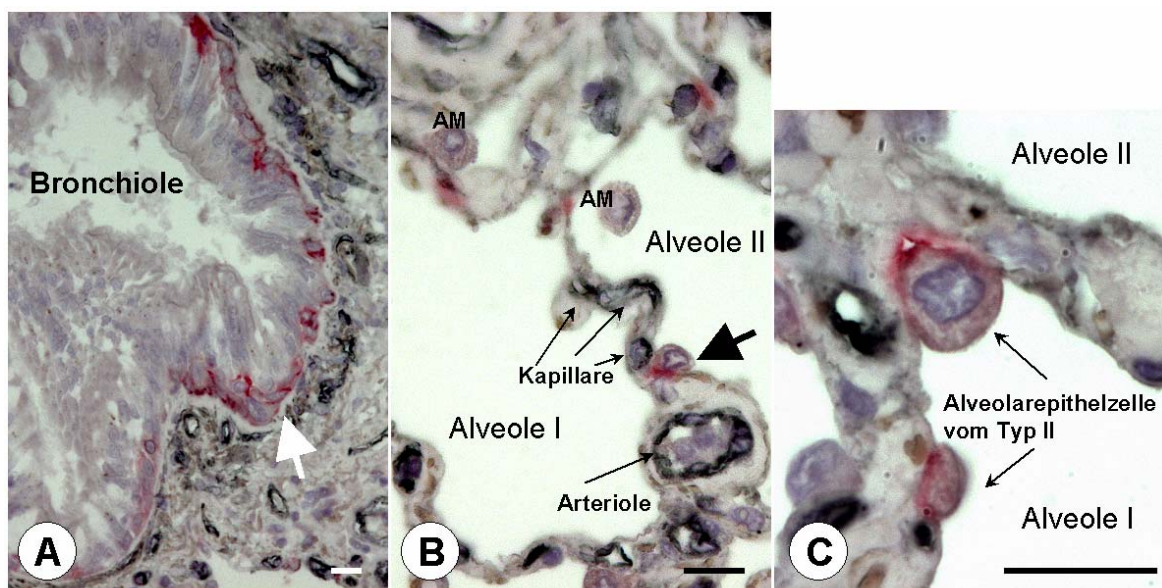


Abb. 18 Nachweis der spezifischen Markierung mit CD44v6 an Zellen des Lungengewebes. Paraffinschnitt von Lungengewebe mit immunzytochemischer Doppelmarkierung von CD44v6 mit AP (rot) und CD31 mit POX (schwarz). Bronchiole mit CD44v6 positiven Basalzellen (A, weisser Pfeil) sowie Alveolen mit CD44v6 positiven Alveolarepithelzellen vom Typ II (B, dicker schwarzer Pfeil) und (C, schwarze Pfeile). Die Endothelzellen sind positiv für CD-31 markiert (A-D, schwarze Färbung). Kerngegenfärbung blau, AM = Alveolarmakrophage. Größenmarkierung = 20 μ m. Im peripheren Lungengewebe reagierte der verwendete CD44v6-Antikörper spezifisch mit den hATII Zellen.

Die positive Selektion der Zielzellen erfolgte nach einer Kulturdauer von vier bis fünf Tagen in P0 unter Einsatz des Enzyms Collagenase I. Zu diesem Zeitpunkt waren vermehrt Zellen mit positiver Immunmarkierung für CD44v6 nachweisbar. Nach der positiven Selektion der Zellen wurden die CD44v6-Beads nicht abgetrennt, da die Proliferation durch die Beads nur unwesentlich beeinflusst wurde. Die Ausbildung einer konfluenten Epithelzellschicht wurde, je nach Isolierung, nach weiteren 4-5 Tagen in P1 erreicht.

Da hATII Zellen in Kultur ihre phänotypischen Eigenschaften rasch verlieren, wurde der Nachweis von spezifischen Markern für Typ II Alveolarepithelzellen zwei Tage nach positiver Selektionierung mit CD44v6-Beads durchgeführt. Die hATII* Kultur war dann 6 Tage alt. Für die Immunfluoreszenz wurden drei für ATII Zellen relevante Marker jeweils in Doppelmarkierung eingesetzt: TTF-1 (grüne Fluoreszenz) mit proSP-C (rote Fluoreszenz) bzw. TTF-1 (grüne Fluoreszenz) mit CD44v6 (rote Fluoreszenz). Alle positiv selektionierten Zellen zeigten in P1 einen, mehr oder weniger stark ausgeprägten, positiven Nachweis für proSP-C (Abb. 19A). Alle Zellen waren positiv für CD44v6 jedoch nicht alle Zellen zeigten eine Expression von TTF-1 (Abb. 19B). Innerhalb dieser TTF-1 positiven Zellen waren nur ca. 1/3 stark positiv für TTF-1.

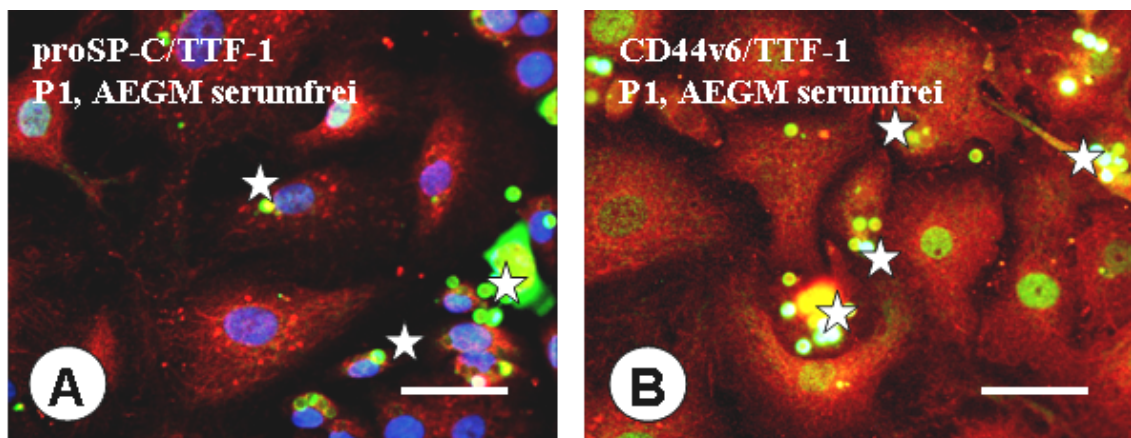


Abb. 19 Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung von hATII-Markern an CD44v6⁺ getrennten hATII* in P1. Immunfluoreszenz-Markierung von CD44v6 getrennten hATII* in erster Passage in serumfreiem AEGM (P1, 6d in Kultur), TTF-1 (grünblau), proSP-C (rot) und Kerngegenfärbung blau (A) bzw. TTF-1 (grün) und CD44v6 (rot) (B). Die stark grünen Punkte (Sterne) entsprechen den CD44v6 Beads. Größenmarkierung = 10 μ m. Nach 6 Tagen in Kultur waren alle Zellen, die mit CD44v6 positiv selektioniert wurden (CD44v6⁺), positiv für proSP-C. Der nukleäre Transkriptionsfaktor TTF-1 wurde in P1 jedoch nur noch schwach exprimiert.

Der Nachweis des Clarazell-Proteins CC-10 war am sechsten Tag der Kultivierung, zwei Tage nach CD44v6-Trennung negativ (Abb. 20B). In P1 waren demnach in der CD44v6 positiven (CD44v6⁺) Zellfraktion keine kontaminierenden Clarazellen mittels Immunfluoreszenz nachweisbar.

Wie bereits gezeigt, kamen in P0 in serumfreiem Medium zwei Zellpopulationen mit unterschiedlicher Morphologie vor (siehe Kap. 3.1.2), man fand abgeflachte Zellen mit fehlender und kuboidale Zellen mit starker Expression von CK14 (Abb. 20A). Die kuboidalen Zellen waren in den serumfrei kultivierten Epithelzellisolaten nach 3-8 Tagen vermehrt nachweisbar, was auf eine

vermehrte Proliferation dieses Zelltyps schließen ließ. Die CD44v6⁺ Zellfraktion wurde in P1 mit CK14 und dem Proliferationsmarker Ki67 mittels Immunfluoreszenz markiert. Dabei sollte festgestellt werden, ob nach CD44v6-Trennung weiterhin wie in P0 CK14 positive und negative Zellen nachweisbar waren und ob die isolierten Zellen proliferativ aktiv waren. Fast alle hATII* der CD44v6⁺ Zellfraktion waren Ki67 positiv und somit proliferativ aktiv (Abb. 20D). Desweiteren zeigten alle CD44v6⁺-selektionierten hATII* einen positiven Nachweis von CK14 (Abb. 20C).

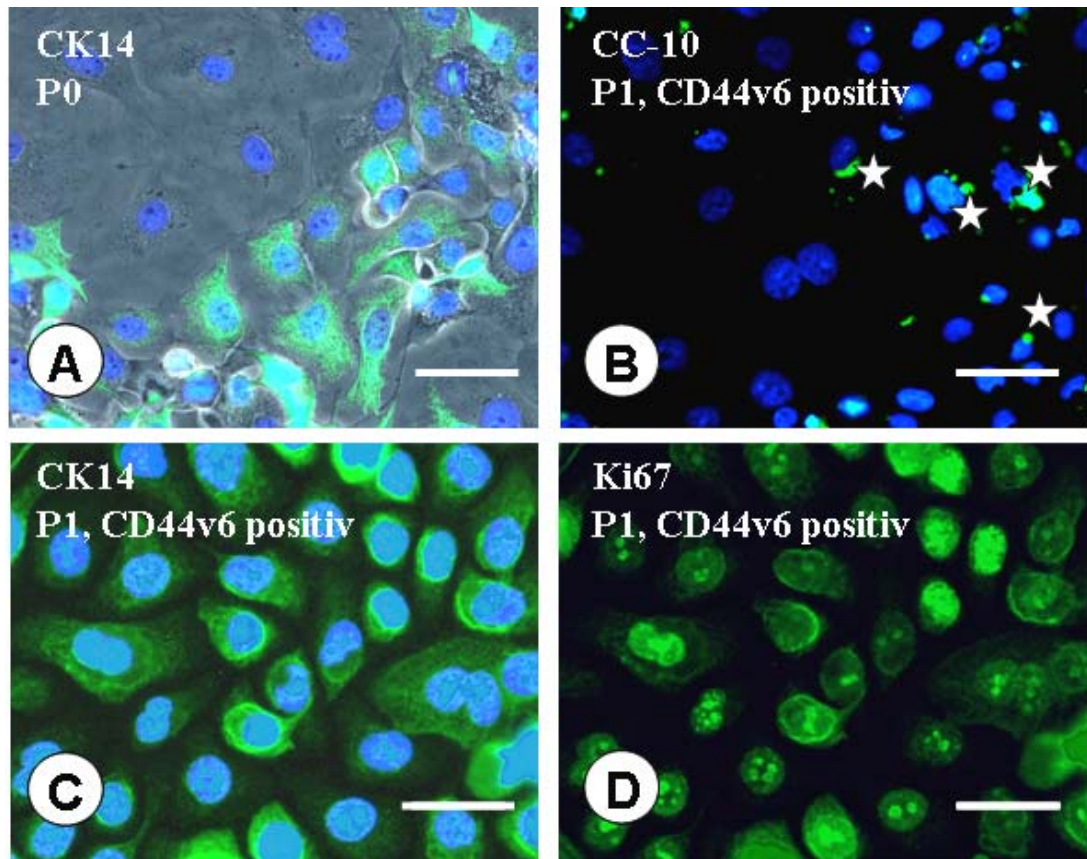


Abb. 20 Immunfluoreszenz-Markierung von CK14, CC-10 und dem Proliferationsmarker Ki67 an CD44v6⁺ getrennten hATII* in P1. Immunfluoreszenz-Markierung von CK14 (grün) an hATII Zellen in P0 am Tag 6 der Kultivierung (A). In P0 traten zwei Populationen von Zellen auf, flach ausgebreitete CK14 negative Zellen und kuboidale, kleinere Zellen, die positiv für CK14 waren. Immunfluoreszenz-Markierung (grün) von CC-10 (B) bzw. CK14 (C) und dem Proliferationsmarker Ki-67 (D). Die CD44v6⁺ getrennten hATII* waren in erster Passage (P1, 9d in Kultur) CC-10 negativ. Die CD44v6⁺ Fraktion zeigte überwiegend kleinere, CK14 (C) und Ki67 (D) positive proliferierende Zellen. Kerngegenfärbung blau (Hoechst 33329), Größenmarkierung = 20 μ m.

Mittels positiver Selektion der CD44v6-positiven hATII* wurde in P1 eine fibroblastenfreie Epithelzellpopulation mit kuboidalem morphologischen Phänotyp erhalten (Abb. 21D), während bei den ungetrennten hATII* vereinzelt langgestreckte Zellen vorkamen (Abb. 21A).

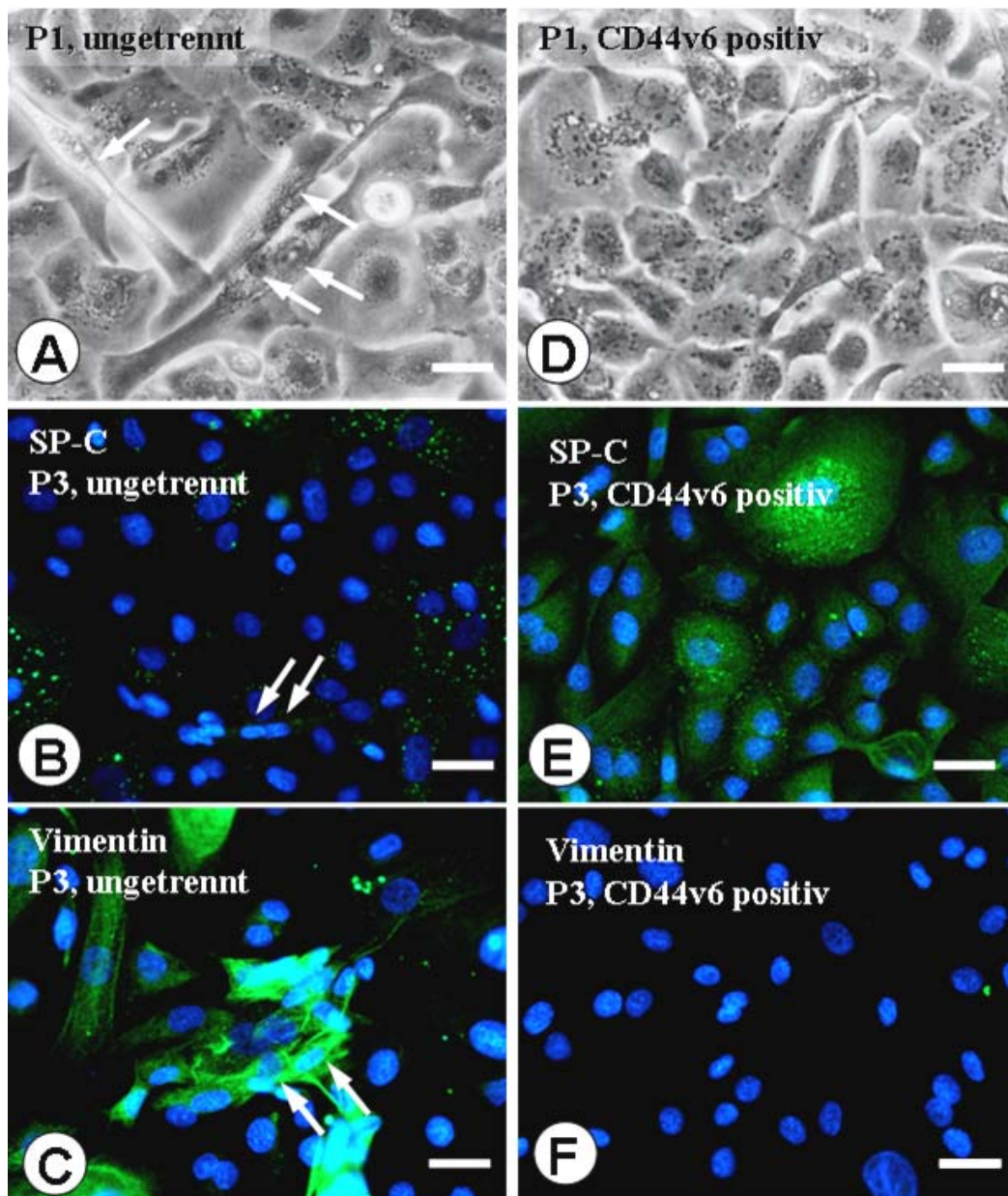


Abb. 21 Morphologie und Immunfluoreszenz-Markierung von SP-C und einem Marker für kontaminierende Fibroblasten bei ungetrennten und CD44v6 getrennten hATII*. Phasenkontrast-Aufnahme von ungetrennten hATII* (A) und mit CD44v6 Beads positiv selektierten hATII* (D) in erster Passage (P1, 10d alt). Immunfluoreszenz-Markierung (grün) des hATII-spezifischen Markers SP-C bei ungetrennten (B) und CD44v6-positiv selektierten hATII* (E) bzw. Immunfluoreszenz-Markierung des für Fibroblasten und Endothelzellen spezifischen Markers Vimentin bei ungetrennten (C) und CD44v6-positiv selektierten hATII* (F) in dritter Passage (P3, 27d alt) in serumfreiem AEGM. Kernegegenfärbung blau (Hoechst 33329), Größenmarkierung = 20 μm . Bei positiver Selektion mit CD44v6-Beads war die Epithelzellpopulation bis zur P3 fibroblastenfrei, während bei den ungetrennten hATII* vereinzelt Fibroblasten mit typischer spindelförmiger, bi- bis multipolarer Ausrichtung vorkamen (A-C, weisse Pfeile).

Die CD44v6-positiv selektionierten Zellen (CD44v6⁺) waren in P3 positiv für SP-C, wobei flacher ausgebreitete Zellen stärker markiert waren als kleinere kuboidale Zellen (Abb. 21E). Auch in P3 blieben die CD44v6⁺ Zellen frei von Vimentin positiven Fibroblasten (Abb. 21F), während diese zunehmend in den ungetrennten hATII Zellen in P3 (Abb. 21C) vorkamen. Nach weiteren fünf Passagen (P6) blieb die Morphologie der Reinkultur erhalten, während sich bei der ungetrennten Kultur vermehrt Fibroblasten durchsetzten.

3.2.5 Morphologischer Phänotyp von CD44v6 positiven Zellen in verschiedenen Medien mit und ohne Serum bzw. Dexamethason

Der morphologische Phänotyp der hATII* Zellen in P1 und P2 wurde mittels Transmissions-Elektronenmikroskope untersucht. Dazu wurden die hATII* in serumfreiem SAGM bzw. AEGM Medium kultiviert.

In serumfreiem SAGM hatten die hATII* in P2 (Abb. 22C, D) im Vergleich zu hATII* in P1 (Abb. 22A, B) auf Filtermembranen einen deutlich unterschiedlichen morphologischen Phänotyp. Die Zellen in P1 waren rundlich kuboidal mit apikalen kurzen Mikrovilli und vielen eher apikal gelegenen Lamellar Bodies. Diese Zellen entsprachen dem für hATII Zellen in P0 beschriebenen morphologischen Phänotyp. Bei den Zellen in P1 waren die Lamellar Bodies zum Teil leer (Abb. 22B, Stern) oder zeigten die für Lamellar Bodies typischen lamellären Membranen (Abb. 22B, Pfeile). Dagegen besaßen die hATII* in P2 eher basolateral gelegene vakuolenartige Strukturen mit Resten von lamellären Membranen (Abb. 22D, Pfeile). Diese vakuolenartigen Strukturen waren mit einem Durchmesser <500 nm ähnlich groß oder kleiner als die Lamellar Bodies der hATII* in P1. Außerdem waren die hATII* in P2 eher kuboidal langgestreckt und hatten längere Mikrovilli als die hATII* in P1. In P2 wurden wenig Zell-Zell-Kontakte zwischen den benachbarten hATII* Zellen ausgebildet. Die hATII* Zellen in zweiter Passage schienen hinsichtlich einer Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten und zelltypspezifischer Strukturen, wie Lamellar Bodies, weniger differenziert als die hATII* in erster Passage.

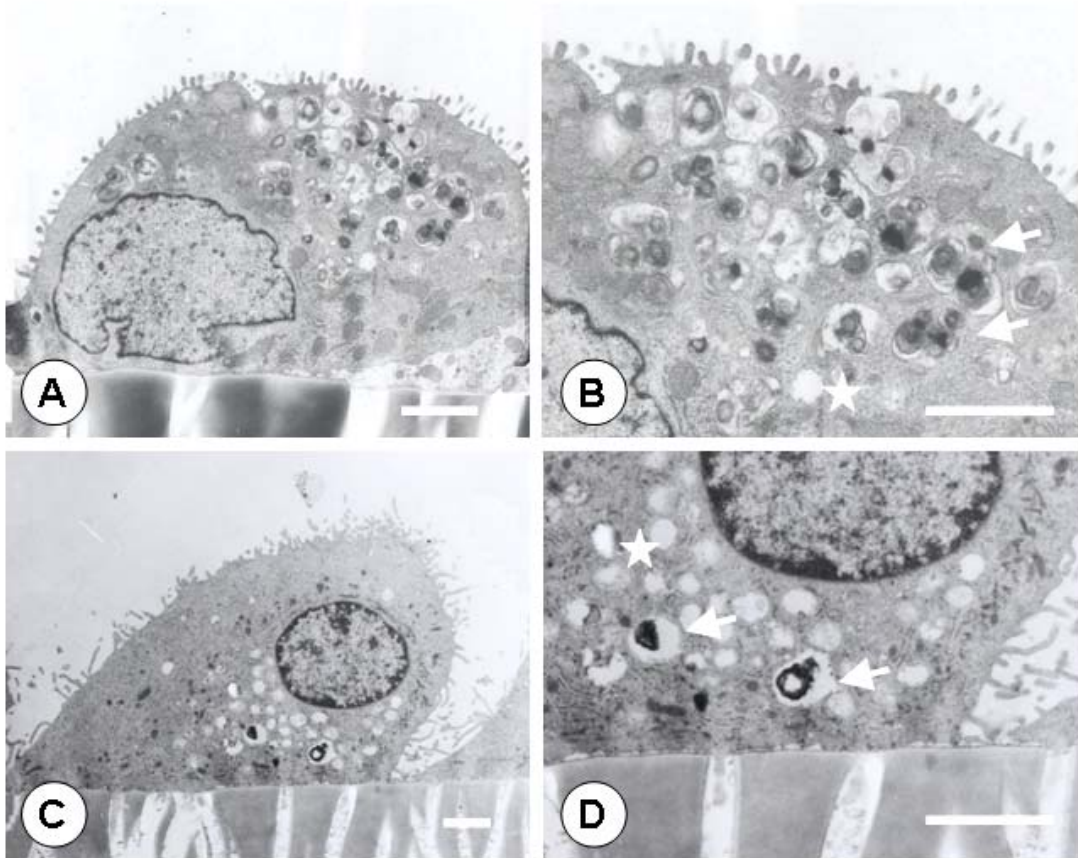


Abb. 22 *Morphologischer Phänotyp isolierter hATII* in erster (P1) und zweiter Passage (P2). TEM der hATII* in P1 in SAGM (A und Vergrößerung B) mit einem für hATII Zellen typischem kuboidalen Phänotyp, Lamellar Bodies (B, Pfeile) und apikalem Mikrovillisaum bzw. TEM der hATII* in P2 in SAGM (C und Vergrößerung D) mit kuboidal nach oben langgestecktem morphologischem Erscheinungsbild und basolateralen leeren vakuolenartigen Strukturen (D, Stern) die zum Teil mit Resten lamellärer Membranen gefüllt waren (D, Pfeile). Größenmarkierung = 1 μm .*

Da CD44v6⁺ hATII* nicht vor der zweiten Passage auf Filtermembranen kultiviert wurden, wurde an CD44v6⁺ hATII* in P2 untersucht, ob Serum die Transdifferenzierung zu ATI-ähnlichen und Dexamethason die Redifferenzierung zu Zellen mit hATII Phänotyp induziert. Dazu wurden CD44v6⁺ hATII* nach Erreichen der Konfluenz (in P1) mit 5×10^4 Zellen pro cm^2 auf die obere Seite der Filtermembran von 24-Well-Transwell Filterplatten ausgesät und in AEGM Medium ohne, mit 1% und mit 5% FKS für 14 Tage kultiviert. Zu einem Teil der Ansätze wurde am Tag 3 der Kultivierung, dem Zeitpunkt an dem ein fast konfluenter Zell-Layer erreicht wurde, $1 \mu\text{M}$ Dexamethason zugegeben.

Während unabhängig vom Serumzusatz alle Dexamethason-behandelten Zellen als kuboidale Monolayer wuchsen (Abb. 23), bildeten die CD44v6⁺ hATII* in P2 ohne Dexamethason 2- bis 3-schichtige Zell-Layer aus (nicht gezeigt). Mit Dexamethason waren zahlreiche perinukleäre vakuolenartige Strukturen, die mit Resten lamellärer Membranen (Abb. 23E, Pfeile) oder Lipidtröpfchen (Abb. 23E, Stern) gefüllt waren, nachweisbar. Vereinzelt wurden auch Multivesikuläre Bodies (Abb. 23E, MVB) ausgebildet.

Die Länge der apikalen Mikrovilli verringerte sich mit dem zunehmenden Gehalt an FKS im Medium (Abb. 23A-C). Außerdem waren in AEGM mit 5% FKS und 1 μ M Dexamethason flacher ausgestreckte Zellen als in Medium ohne oder mit 1% FKS nachweisbar, die Zellen enthielten aber noch zahlreiche vakuolenartige Strukturen. Für die CD44v6⁺ hATII* in P2 wurden trotz Zugabe von Dexamethason und Serum wenig Zell-Zell-Kontakte zwischen den benachbarten hATII* Zellen ausgebildet.

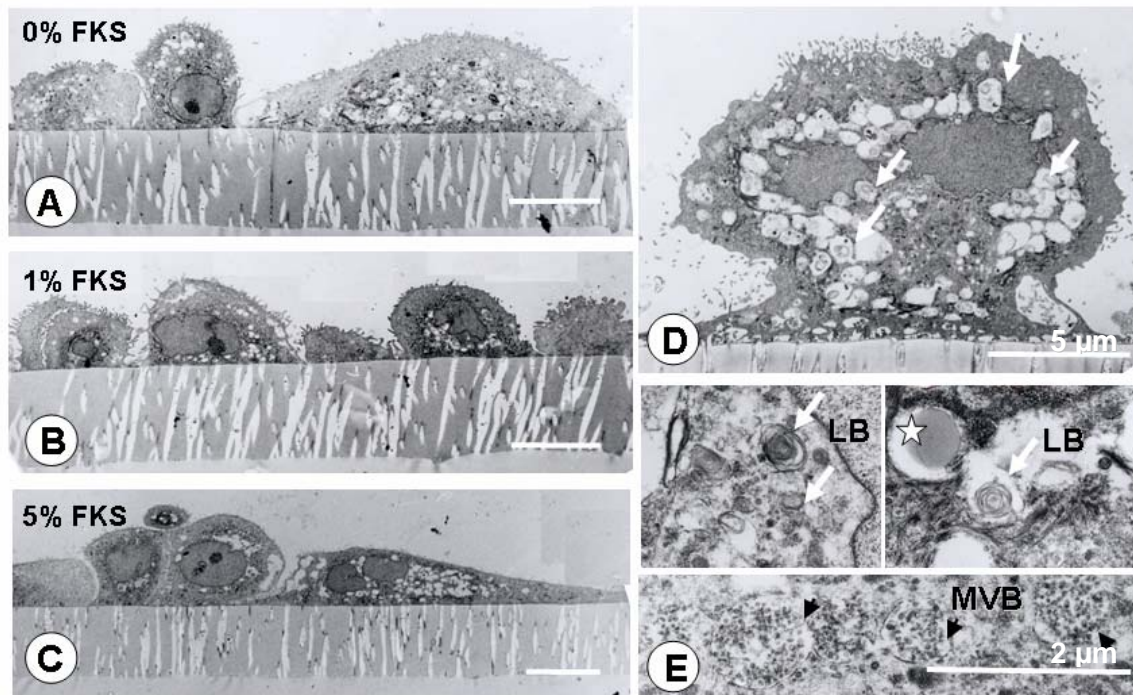


Abb. 23 *Morphologischer Phänotyp der CD44v6⁺ isolierten hATII* mit 1 μ M Dexamethason in zweiter Passage (P2). TEM der CD44v6⁺ hATII* (P2) nach 14-tägiger Kultivierung auf Filtermembranen in serumfreiem AEGM (A und Vergrößerung D) mit einem für hATII Zellen typischem kuboidalen Phänotyp, zahlreichen Lamellar Bodies (LB) (D, Pfeile) und apikalem Mikrovillisaum und TEM der hATII* in P2 in AEGM mit 1% FKS (B) bzw. 5% FKS (C) mit kuboidal bis abgeflachtem morphologischem Erscheinungsbild. Unabhängig vom Serumgehalt fand man perinukleäre vakuolenartigen Strukturen, die mit Resten lamellärer Membranen (E, Pfeile) oder Lipidtröpfchen (E, Stern) gefüllt waren, vereinzelt waren Multivesikuläre Bodies (MVB) nachweisbar. Größenmarkierung = 10 μ m (A,B,C), 5 μ m (D) und 2 μ m (E).*

3.3 Entwicklung der gemeinsamen Kulturbedingungen für Zell-Linien in Mono-Kultur

Um eine Ko-Kultur von endothelialen und epithelialen Zellen zu etablieren, wurde nach einem Medium gesucht, in dem beide Zelltypen gut proliferieren und differenzieren. Primär kultivierte Endothelzellen und auch Endothelzell-Linien benötigen Serum und Wachstumsfaktoren zur optimalen Proliferation. In Vorversuchen wirkten die Wachstumsfaktoren bFGF und Heparin in einer Konzentration von 2,5 ng/ml bFGF und 10 µg/ml Heparin in ECGM-MV mit 15% FKS bei der Endothelzell-Linie ISO-HAS-1 proliferationssteigernd und zeigten mit Maximalwerten von $1,5 \cdot 10^5$ Zellen/cm² vergleichbare Zelldichten wie in dem für ISO-HAS-1 beschriebenen Standardmedium (ECGM-MV mit 15% FKS und ECGS (50 ng/ml) und Heparin (50 µg/ml)). Mit Hilfe von Langzeitkulturen wurde daher das Proliferations- und Differenzierungs-Verhalten der Zellen in Mono-Kultur in verschiedenen Medien mit bFGF und Heparin als Wachstumsfaktoren vergleichend analysiert. Außerdem wurde der Einfluss des FKS-Gehalts auf die Proliferationsrate und Differenzierung im Hinblick auf die Ausbildung endothelialer- und epithelialer Monolayer untersucht. Die mit den Standardmedien am Besten übereinstimmenden Ergebnisse ergaben sich mit MCDB 131 mit 5% FKS, bFGF (2,5 ng/ml) und Heparin (10 µg/ml) (siehe Anhang).

Die Zell-Linien ST1-6.R und A549 zeigten unabhängig vom Medium eine kontinuierliche Zunahme der Zellzahl über den gesamten Kultivierungszeitraum. Ähnlich zu A549 schienen ST1-6.R unter den gewählten Kulturbedingungen keinen Monolayer auszubilden. Daher wurde die Zell-Linie ISO-HAS-1 als endotheliale Zell-Linie für die spätere Ko-Kultur ausgewählt.

A549 gelten im Vergleich zu den weiteren epithelialen Zell-Linien, NCI H441 und NCI H820, als eine in der Literatur anerkannte Zell-Linie mit Eigenschaften humaner Alveolarepithelzellen vom Typ II. Aus diesem Grund wurde weiter versucht, die Ausbildung eines Monolayers von A549 Zellen über die Variation des Serumgehalts zu induzieren. Mit der Erniedrigung des Serumgehalts auf 1% FKS schien eine Manipulation der Proliferation von A549 möglich und die Zelldichte konnte vom Tag 10 bis zum Tag 14 relativ stabil um einen Wert von $2,5 \cdot 10^5$ Zellen /cm² gehalten werden (siehe Anhang). Diese Zellzahl entsprach etwa der Hälfte der unter gleichen Kulturbedingungen mit 5% FKS erzielten Maximalwerte. Obwohl die Zellzahl bei 1% Serumzusatz konstant gehalten werden konnte, wurde das *Adherens Junction* Protein E-Cadherin immunzytochemisch nur in Arealen mit lokalen Zellaggregaten an den Zell-Zell-Grenzen der A549 Zellen markiert (siehe Anhang).

3.4 Charakterisierung der Mono-Kultur im Ko-Kulturmedium

Die vorangegangenen Ausführungen verdeutlichen, dass MCDB 131 mit bFGF (2,5 ng/ml), Heparin (10 µg/ml) und 5% FKS hinsichtlich der Proliferationsrate von NCI H441, A549 und ISO-HAS-1 ein geeignetes gemeinsames Medium darstellt. Diese Mediumzusammensetzung von MCDB 131 mit bFGF (2,5 ng/ml) und Heparin (10 µg/ml) wird im Folgenden als Ko-Kulturmedium bezeichnet.

Um den Einfluss des Ko-Kulturmediums auf verschiedene Marker der endothelialen bzw. epithelialen Zell-Linien zu ermitteln, wurden Morphologie und biochemische Eigenschaften in MCDB 131 mit bFGF/Heparin (2,5 ng/10 µg/ml) und 5% FKS untersucht. Hier wurde erstmals eine weitere epitheliale Zell-Linie, NCI H820, verwendet, die als den hATII Zellen ähnlich beschrieben wurde (Gazdar et al., 1990).

3.4.1 Morphologie von ISO-HAS-1, A549, NCI H441 und NCI H820

Der morphologische Phänotyp der Zell-Linie ISO-HAS-1 ähnelt dem von HPMEC in MCDB 131 mit 5% FKS, bFGF (2,5 ng/ml) und Heparin (10 µg/ml) (Abb. 24A und B).

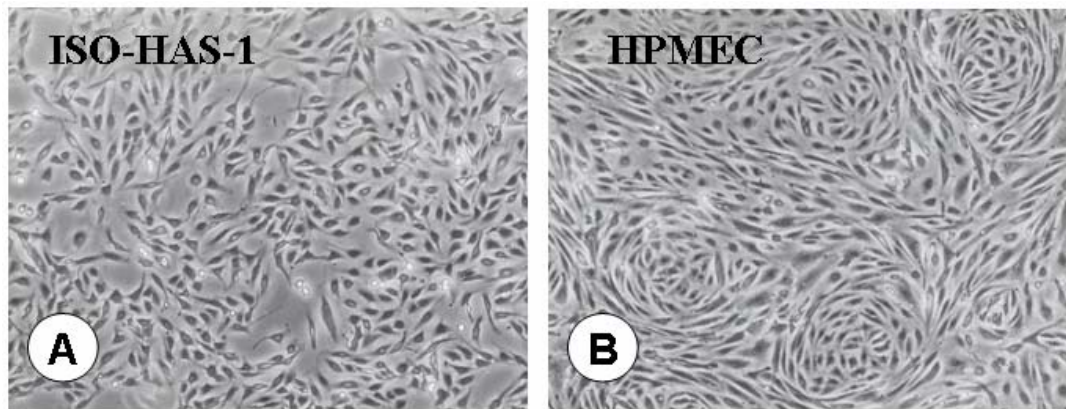


Abb. 24 Lichtmikroskopische Aufnahmen des morphologischen Phänotyps von ISO-HAS-1 und primär isolierten HPMEC. Morphologischer Phänotyp der mikrovaskulären Endothelzell-Linie ISO-HAS-1 (A) im Vergleich zu primär isolierten HPMEC (B) in MCDB 131 mit 5% FKS, bFGF (2,5 ng/ml) und Heparin (10 µg/ml). Lichtmikroskopie (100x). Beide endothelialen Zelltypen zeigten ein ähnliches Wachstumsmuster.

A549 (Abb. 25A) und NCI H820 (Abb. 25C) bildeten im Ko-Kulturmedium eine regelmäßige Zellschicht aus. NCI H441 neigten dagegen zur Bildung von Zellaggregaten und einer Ausbildung von Lücken im Zell-Layer (Abb. 25B). Das Ko-Kulturmedium war für die Ausbildung eines konfluenten Monolayers von NCI H441 Zellen nicht geeignet.

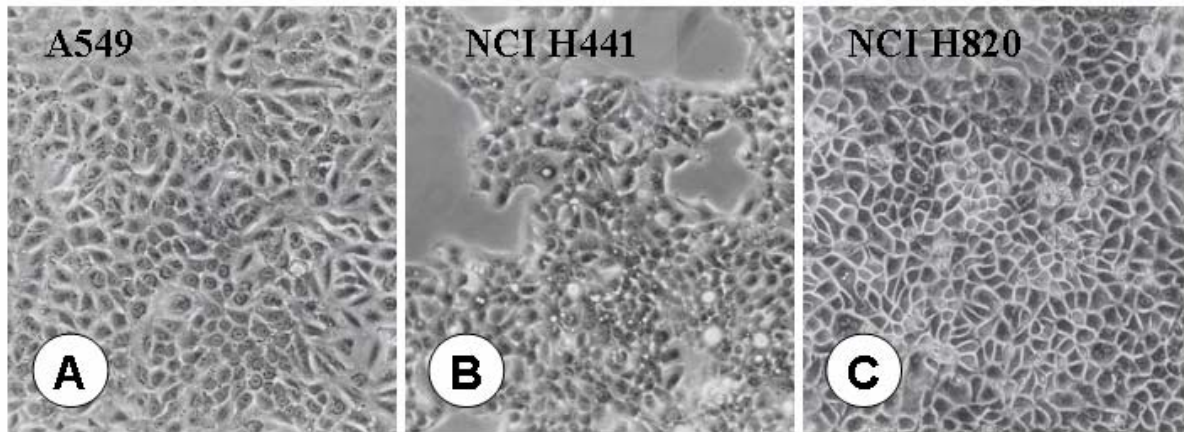


Abb. 25 Lichtmikroskopische Aufnahmen des morphologischen Phänotyps der Epithelzell-Linien A549, NCI H441 und NCI H820. Morphologischer Phänotyp der Epithelzell-Linien A549 (A), NCI H441 (B) und NCI H820 (C) in MCDB 131 mit 5% FKS, bFGF (2,5 ng/ml) und Heparin (10 µg/ml). Lichtmikroskopie (100x). Die epithelialen Zell-Linien zeigten ein ähnliches Wachstumsmuster in Ko-Kulturmedium. NCI H820 und A549 wuchsen als konfluente Layer, NCI H441 wiesen häufig Lücken im Zell-Layer auf.

3.4.2 Phänotypische Merkmale der endothelialen und epithelialen Zell-Linien

Die endotheliale Zell-Linie ISO-HAS-1 zeigte alle untersuchten phänotypischen Merkmale von Endothelzellen (Tab. 11).

Tab. 11: Charakterisierung von ISO-HAS-1 im Vergleich zu HPMEC im Ko-Kulturmedium

Marker	Zelltyp	
	HPMEC	ISO-HAS-1
Caveolin-1	+ ¹⁾	+ ¹⁾
vWF	++	++
PECAM-1	+++	+++
VE-Cadherin	++	++
ICAM-1 *	++	++
E-Selektin *	+++	+++
VCAM-1 *	±	- ¹⁾ + ²⁾

Nachweis mittels Immunfluoreszenz (IF) und ¹⁾ Western blot ²⁾ PCR, * Stimulation mit TNF-α (300 U/ml) für 6h, - bezeichnet keine, ± eine vereinzelte, + eine schwache und ++ eine starke Markierung mit Fluorochrom

Die primär isolierten HPMEC und die Zell-Linie ISO-HAS-1 hatten ein ähnliches morphologisches Erscheinungsbild. HPMEC und ISO-HAS-1 zeigten beide eine perinukleäre, punktförmige Expression von vWF (FVIII-rA), die schwächer als bei humanen Umbilicalvenen-Endothelzellen (HUVEC) erschien (nicht gezeigt). Die stimulationsabhängige Expression von ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin bei HPMEC und ISO-HAS-1 wird in Kap. 3.6 näher beschrieben.

Die Charakterisierung der Epithelzell-Linien A549, NCI H441 und NCI H820 erfolgte in Ko-Kulturmedium mit einem FKS-Anteil von 5%. Da die Kultivierung von NCI H820 in serumfreiem Medium (DHSF, siehe Kap. 2.7.2) beschrieben ist und auch die hATII-Eigenschaften von Primärzellen in serumfreiem Medium erhalten bleiben, wurden die Eigenschaften von NCI H820 vergleichend in serumfreiem DHSF und Ko-Kulturmedium untersucht.

Mittels indirekter Immunfluoreszenz-Färbung wurde bei NCI H441 und NCI H820 die Expression aller untersuchten Marker für Alveolarepithelzellen von Typ II nachgewiesen (Tab. 12). A549 zeigten demgegenüber weder im Ko-Kulturmedium noch in Standardmedien (DMEM oder Häm's F12/Iscove's-Medium) eine Expression von TTF-1 (nicht gezeigt). Außerdem war die Expression von Zell-Zell-Kontaktmolekülen bei A549 wenig ausgeprägt. So zeigten A549 kaum eine Expression des *Adherens Junction* Proteins E-Cadherin (siehe Anhang), wobei bei NCI H441 (nicht gezeigt) und NCI H820 E-Cadherin deutlich an den Zell-Zell-Grenzen exprimiert wurde (Abb. 26C und G). Bei NCI H441 (Abb. 62, S.123) und NCI H820 (Abb. 26A und E) zeigte sich eine feine kontinuierliche Markierung für das *Tight Junction* Protein ZO-1 an den Zell-Zell-Kontakten. In A549 war dieser Marker nicht oder nur fragmentiert nachweisbar (nicht gezeigt).

Tab. 12: Charakterisierung von A549, NCI H441 und NCI H820 im Ko-Kulturmedium anhand von Markern für ATII Zellen

Marker	Zelltyp			
	A549	H441	H820	DHSF
Lamellar Bodies	+++	+	+	++
Alkal. Phosph.	±	n.b.	n.b.	n.b.
SP-A	++	++	+	++
SP-B	+	++	±	+
SP-C	++	+	+	++
SP-D	++	+	++	++
TTF-1	-	++	+	++
CD44v6	+	+	+	+
CK 8	+	+	n.b.	n.b.
CK 18	++	++	n.b.	n.b.
CK 19	-	+	n.b.	n.b.
E-Cadherin	±	+	+	+
ZO-1	± ¹⁾ + ³⁾	++	++	++

¹⁾ Immunfluoreszenz (IF), ²⁾ Western blot, ³⁾ PCR, n.b. = nicht bestimmt, - bezeichnet keine, ± eine vereinzelte, + eine schwache und ++ eine starke Markierung mit Fluorochrom; DHSF= DMEM/Häm's F12 mit SF Mix (siehe Kap. 3.7.2)

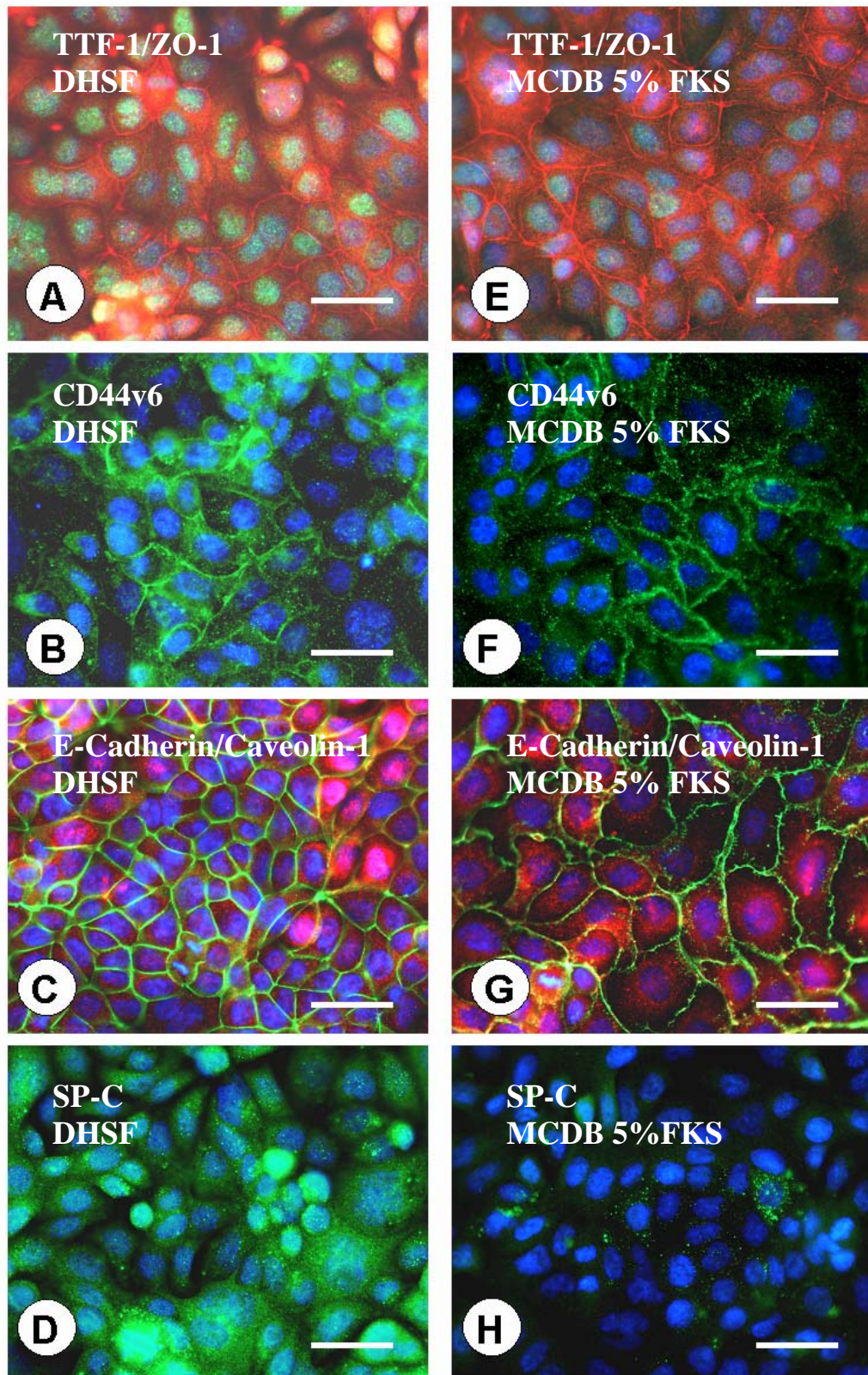


Abb. 26 Immunfluoreszenz-Markierung von *hATII*-Markern an NCI H820 Zellen in serumfreiem und serumhaltigem Medium. Immunfluoreszenz-Markierung von NCI H820 in serumfreiem DHSF (A-D) bzw. in Ko-Kulturmedium (E-H) für TTF-1 (grün) und ZO-1 (rot) (A bzw. E); CD44v6 (grün) (B bzw. F); E-Cadherin (grün) und Caveolin-1 (rot) (C bzw. G); SP-C (grün) (D bzw. H). Kerngegenfärbung blau, Größenmarkierung = 10 μ m. NCI H820 zeigten sowohl in serumfreiem als auch in serumhaltigem Medium gut ausgeprägte Zell-Zell-Kontakte, die Expression von TTF-1 und SP-C war jedoch in serumhaltigem Medium gegenüber der Kultur in serumfreiem Medium stark reduziert.

NCI H820, die in serumhaltigem Medium kultiviert wurden, zeigten eine schwächere nukleäre Expression von TTF-1 (Abb. 26A und 26E) und eine weniger starke Markierung mit anti-SP-C (Abb. 26D und 26H) als in serumfreiem Standardmedium (DHSF) kultivierte NCI H820. Außerdem zeigten die NCI H820 in Ko-Kulturmedium einen flacher ausgestreckten morphologischen Phänotyp (Abb. 26C und 26G). Dieses Verhalten ähnelt den zu ATI-ähnlichen Zellen transdifferenzierten hATII Zellen in serumhaltigem Medium.

A549, NCI H441 und NCI H820 waren CK14 negativ, jedoch alle leicht positiv für Caveolin-1. NCI H441 zeigten im Vergleich zu NCI H820 mit einer schwach positiven Markierung von CC-10 (Abb. 27B) und dem Vorkommen von Multivesikulären Bodies (MVB, Abb. 28A) Clarazell-Eigenschaften. NCI H820 waren für CC-10 negativ (Abb. 27A).

Tab. 13: Charakterisierung von A549, NCI H441 und NCI H820 anhand von Markern für ATI Zellen, Clarazellen und Basalzellen in situ

Marker	Zelltyp		
	A549	H441	H820
Caveolin-1	+ ¹⁾ + ²⁾	+ ¹⁾ + ²⁾	+
CC-10	n.b.	+	-
MVB	+	++	-
CK14	-	-	-

¹⁾ Immunfluoreszenz (IF), ²⁾ Western blot, ³⁾ PCR, n.b. = nicht bestimmt

In Ko-Kulturmedium mit 5% FKS konnten bei A549 und NCI H441 alle vier Surfactantproteine nachgewiesen werden. Abbildungen 29A-D zeigen die Expression von SP-A bis D bei A549 mittels Immunfluoreszenz. Die stärkste Expression findet sich bei A549 für SP-D gefolgt von SP-A. Auch die Zell-Linie NCI H441 zeigte, außer der auch für Clarazellen beschriebenen Synthese von SP-A, SP-B und SP-D (Abb. 29E, F und H), einen positiven Immunfluoreszenznachweis von SP-C (Abb. 29G). Eine weitere Bestätigung der aktiven Synthese von Surfactant lieferte der elektronenmikroskopische Nachweis von Lamellar Bodies bei A549, NCI H441 (Abb. 28B und C) und NCI H820. Für NCI H820, deren Kultivierung in serumfreiem Medium DHSF beschrieben wird, hatte der Einsatz von Ko-Kulturmedium einen reduzierenden Einfluss auf die Expression der Surfactant-Proteine SP-A, SP-B und SP-C (Abb. 30 A-C und 30 E-H). Besonders die Expression von SP-A und SP-C wurde durch die Kultivierung in Ko-Kulturmedium im Vergleich zu serumfreiem DHSF stark reduziert.

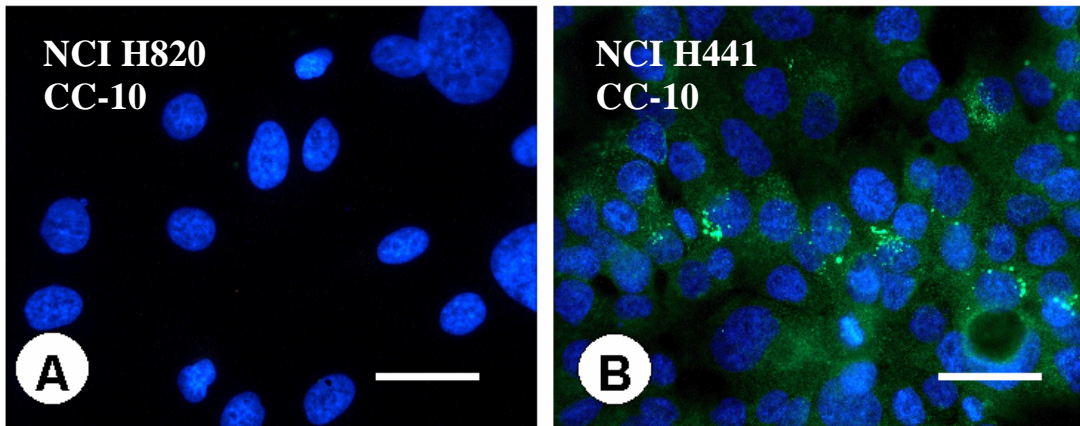


Abb. 27 Immunfluoreszenz-Markierung des Clarazell-Markers CC-10 an NCI H441 und NCI H820 Zellen in Ko-Kulturmedium. Nachweis des Clarazell-Proteins CC-10 bei NCI H820 (A) und NCI H441 (B) mittels Immunfluoreszenz (grün), Kerngegenfärbung blau, Größenmarkierung = 10 μm . NCI H441 exprimierten CC-10 und zeigten somit im Gegensatz zu NCI H820 auch Eigenschaften von Clarazellen.

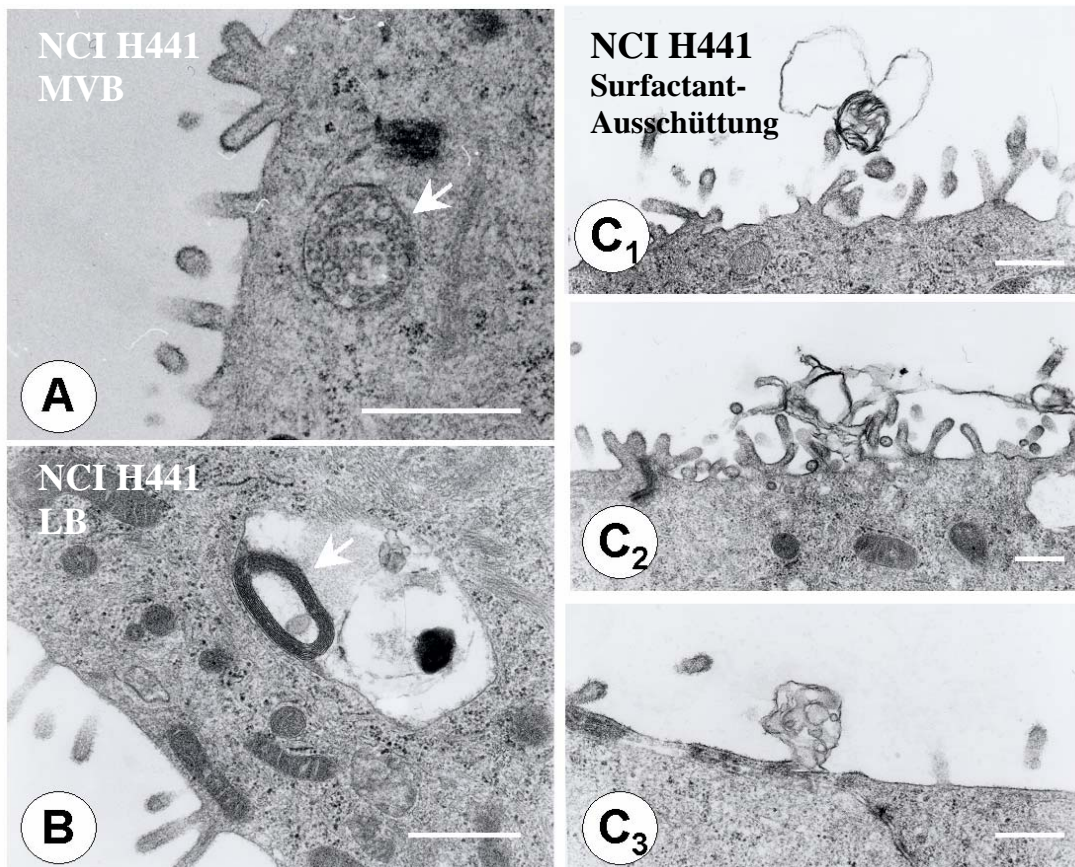


Abb. 28 Elektronenmikroskopie von Multivesikulären und Lamellar Bodies in NCI H441. Nachweis von Multivesikulären (A, weisser Pfeil) und Lamellar Bodies (B, weisser Pfeil) in NCI H441. Verschiedene Stadien der Ausschüttung von Surfactant-Material (C_1 - C_3) bei NCI H441. TEM, Größenmarkierung = 1 μm . Lamellar Bodies wiesen auf die Produktion von Surfactant bei NCI H441 Zellen hin. Multivesikuläre Körperchen sind typische Einschlusskörperchen von Clarazellen.

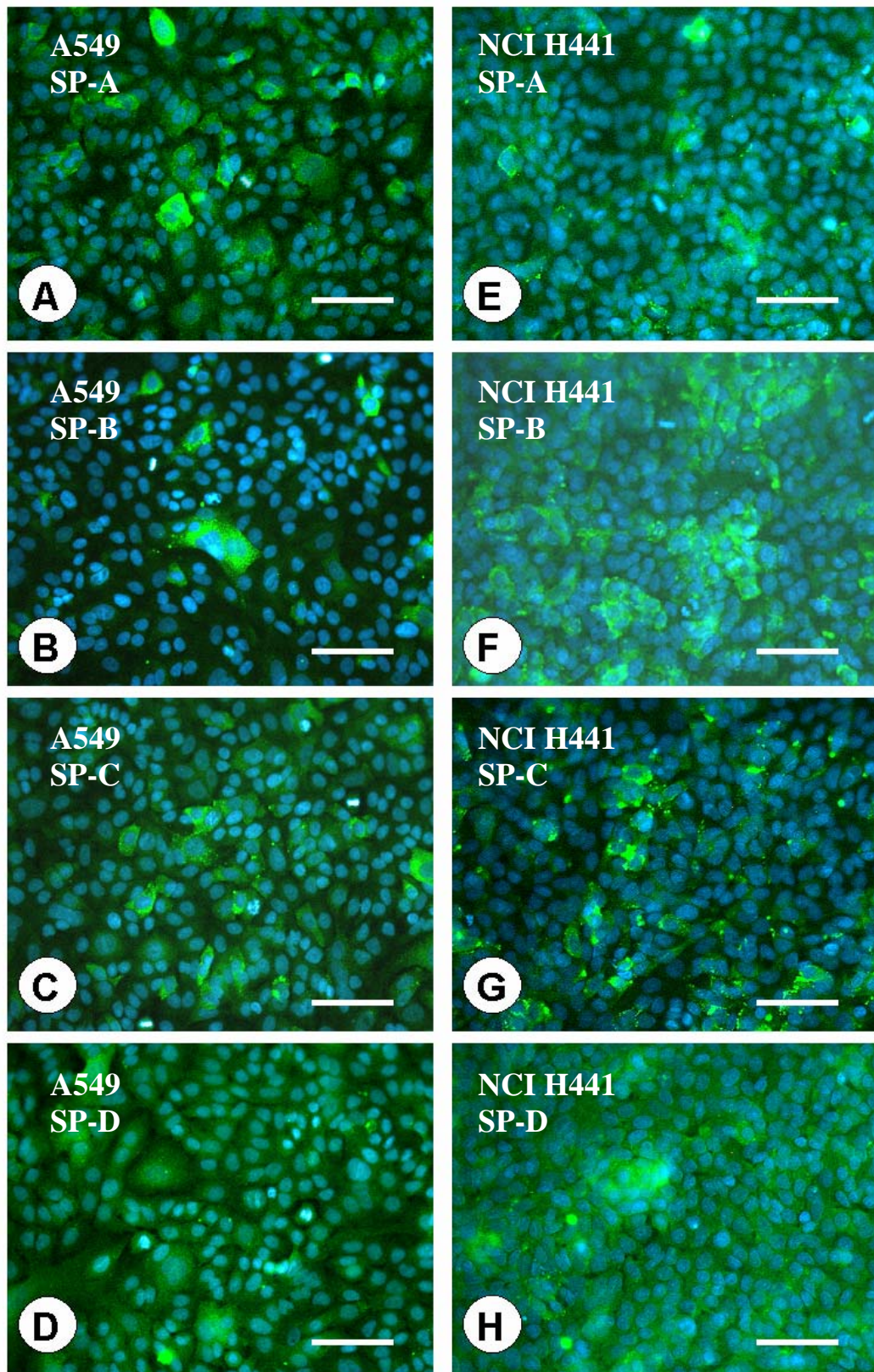


Abb. 29 Immunfluoreszenz-Markierung der Surfactantproteine bei A549 bzw. NCI H441 Zellen in Ko-Kulturmedium. A549 (A-D) bzw. NCI H441 (E-H) in MCDB 131 mit 5% FKS, bFGF/Heparin (2.5ng/10µg/ml). Immunfluoreszenz-Markierung (grün) von SP-A (A bzw. E), SP-B (B bzw. F), SP-C (C bzw. G) und SP-D (D bzw. H). Kerngegenfärbung blau, Größenmarkierung = 50 µm. A549 und NCI H441 Zellen exprimierten alle vier Surfactantproteine.

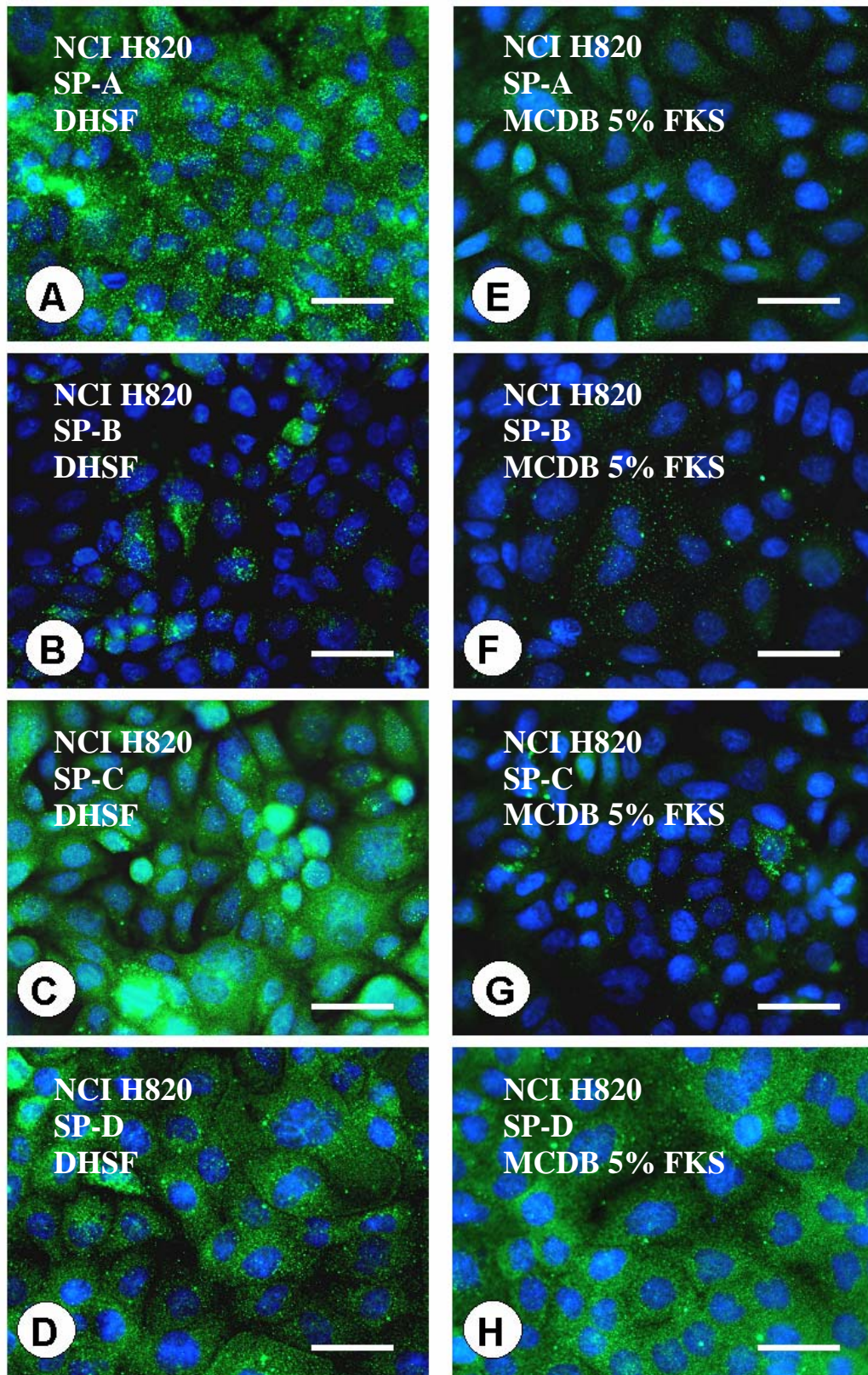


Abb. 30 Immunfluoreszenz-Markierung der Surfactantproteine bei NCI H820 Zellen in serumfreiem und serumhaltigem Medium. NCI H820 kultiviert in serumfreiem DHSF (A-D) bzw. in Ko-Kulturmedium (E-H). Immunfluoreszenz-Markierung (grün) von SP-A (A bzw. E), SP-B (B bzw. F), SP-C (C bzw. G) und SP-D (D bzw. H). Kerngegenfärbung blau, Größenmarkierung = 20 μ m. NCI H820 zeigten in serumfreiem und serumhaltigem Medium alle vier Surfactantproteine. Die Expression von SP-A und SP-C war in serumhaltigem Medium gegenüber der Kultur in serumfreiem Medium stark reduziert, während die Expression von SP-B und SP-D wenig verändert war.

3.4.3 Einfluss von Dexamethason auf Proliferation und Differenzierung von NCI H441

Bei der Charakterisierung der Zell-Linien (Kap. 3.4.2) in Ko-Kulturmedium konnte gezeigt werden, dass sowohl Marker für ATII als auch Zell-Zell-Kontakte bei den epithelialen Linien NCI H441 und NCI H820 gut ausgeprägt sind. Jedoch nur bei NCI H820 wurde ein Plateau der Wachstumskurve, ähnlich wie bei ISO-HAS-1, nach 10 Tagen in Ko-Kulturmedium erreicht (Abb. 31). NCI H441 zeigten dagegen einen stetigen Anstieg der Zellzahl, ähnlich dem von A549. Eine inhibierende Wirkung des Glukokortikoids Dexamethason auf das Wachstum von A549 Zellen wurde bereits gezeigt (Greenberg et al., 2002). Daher sollte der Einfluss von Dexamethason auf die Proliferation und Ausbildung eines epithelialen Monolayers von NCI H441 untersucht werden.

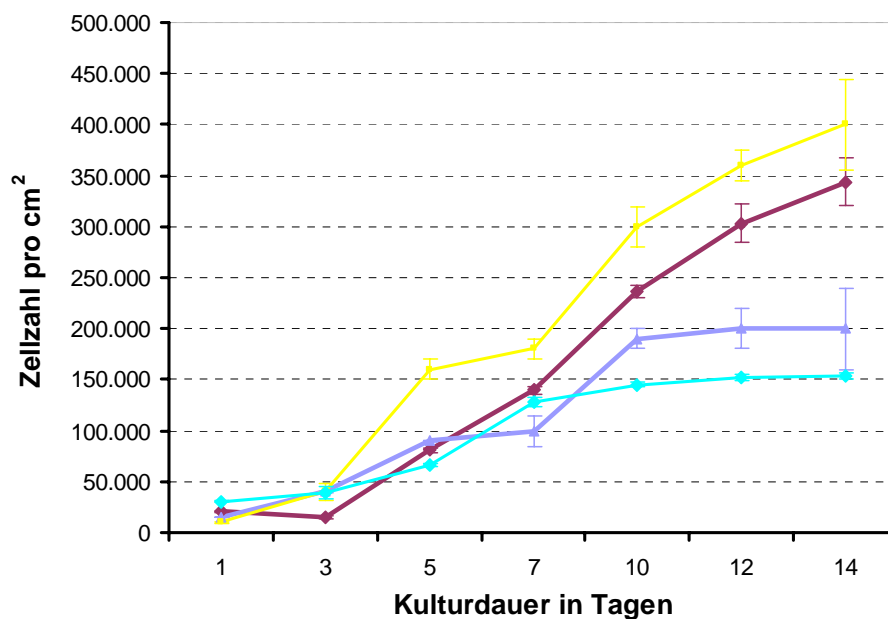


Abb. 31 Proliferationskurve der Zell-Linien A549, NCI H441, NCI H820 und ISO-HAS-1 in Ko-Kulturmedium. Entwicklung der Zellzahl im Verlauf der Kultur der epithelialen Zell-Linien A549 (■—■), NCI H441 (◆—◆) und NCI H820 (◇—◇) sowie der endothelialen Zell-Linie ISO-HAS-1 (▲—▲) in MCDB 131 mit 5% FKS und bFGF/Heparin (2,5 ng/10 µg/ml). Die Wachstumskurve von NCI H820 und ISO-HAS-1 erreichte nach 10 Tagen in Ko-Kulturmedium ein Plateau, während die Zellzahl von A549 und NCI H441 stetig anstieg.

3.4.3.1 Bestimmung der Zellzahl im Verlauf der Kultur mit Dexamethason

Im Verlaufe einer 14tägigen Kultivierung wurde die Wirkung verschiedener Konzentrationen des Glukokortikoids Dexamethason auf die Proliferation der Zell-Linie NCI H441 untersucht. Als Kulturmedium wurde RPMI 1640 mit 10% FKS verwendet, da NCI H441 in diesem Standardmedium deutlich gleichmäßiger wuchsen und nicht, wie im Ko-Kulturmedium, lokale Lücken im Zell-Layer auftraten, die sich bei der späteren Kultur auf Filtermembranen als störend für den Aufbau einer gleichmäßig dichten epithelialen Zellschicht herausstellten (siehe Kap. 3.8.1). Zunächst wurden die Zellen 3 Tage, bis Erreichen eines subkonfluenten Zell-Layers, in RPMI 1640 mit 10% FKS ohne Dexamethason kultiviert. Am Tag 3 erfolgte die Zugabe verschiedener Konzentrationen Dexamethason (100 nM, 200 nM, 500 nM und 1 µM). Die Proliferation der Dexamethason-

behandelten Zellen wurde mit der der unbehandelten Kontrolle verglichen. An Tag 7, 4 Tage nach Zugabe von Dexamethason, war die Zellzahl der behandelten Zellen bereits deutlich gegenüber der unbehandelten Kontrolle reduziert. Während bei Konzentrationen bis 500 nM Dexamethason nur ein verzögerter Anstieg der Zelldichte nachweisbar war, erreichte die Proliferationskurve bei der Zugabe von 1 μM Dexamethason nach 13-14 Tagen ein Plateau (Abb. 32). Nach Zugabe von 1 μM Dexamethason wurde eine Zelldichte von $1,75 \times 10^5$ Zellen/ cm^2 erreicht. Die unbehandelte Probe zeigte mit $4,42 \times 10^5$ Zellen/ cm^2 nach 14 Tagen eine im Vergleich zu 1 μM Dexamethason 2,5fache Zelldichte. Nach Zugabe von 1 μM Dexamethason zum Kulturmedium wurde eine deutlich reduzierte Proliferation von NCI H441 beobachtet. Ob diese reduzierte Proliferation im Zusammenhang mit einer Differenzierung der Zellen und der Ausbildung eines dichten epithelialen Monolayers von NCI H441 stand, wurde bei der Kultur der Zellen auf permeablen Filtermembranen im Kapitel Ko-Kultur (Kap. 3.8) untersucht.

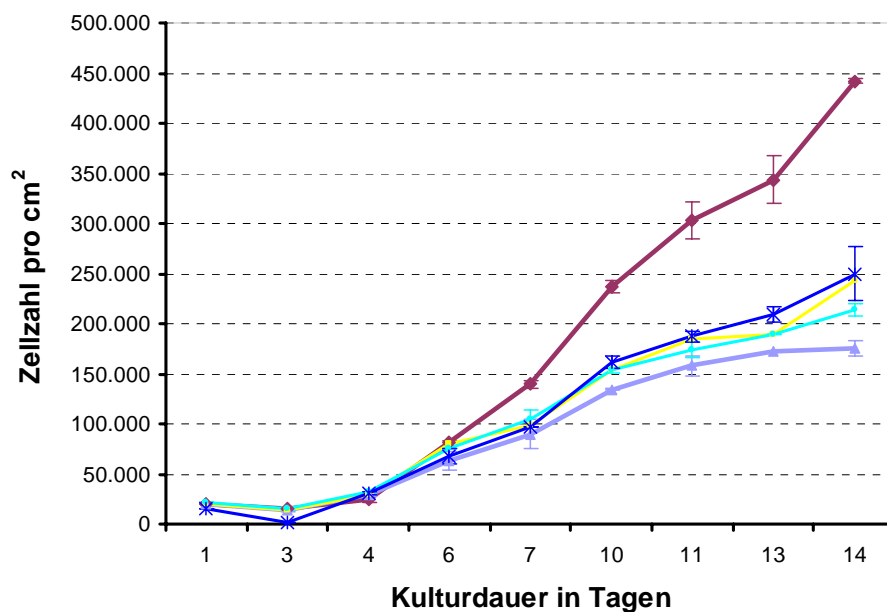


Abb. 32 Proliferationskurve der Zell-Linie NCI H441 mit und ohne Dexamethason. Entwicklung der Zellzahl im Verlauf der Kultur der epithelialen Zell-Linie NCI H441 in RPMI 1640 mit 10% FKS ohne (\blacklozenge — \blacklozenge) und mit 100 nM (\blacksquare — \blacksquare), 200 nM (\bullet — \bullet), 500 nM (\times — \times) und 1 μM Dexamethason (\blacktriangle — \blacktriangle). Die Wachstumskurve von NCI H441 erreichte nach 11-14 Tagen in Ko-Kulturmedium mit 1 μM Dexamethason ein Plateau.

3.4.3.2 Wirkung von Dexamethason auf die Freisetzung von Wachstumsfaktoren

Wachstum und die Differenzierung von Zellen in Ko-Kultur werden durch die Freisetzung von Wachstumsfaktoren beeinflusst. In folgenden Experimenten wurde untersucht, ob Dexamethason, wie für humane pulmonale Fibroblasten und Glioma-Zell-Linien der Ratte gezeigt wurde (Nauck et al., 1997; Machein et al., 1999), die Freisetzung des angiogenen Wachstumsfaktors VEGF beeinflusst. Die vermehrte Freisetzung von VEGF könnte in Ko-Kultur mit Endothelzellen die Ausbildung eines konfluenten Monolayers der Endothelzellen beeinflussen und die Ausbildung kapillarähnlicher Strukturen induzieren. Außerdem wurde die mit inflammatorischen Prozessen der Lunge in

Verbindung gebrachte Erhöhung von VEGF (Thickett et al., 2002; Bhatia und Moochhala, 2004), die nach Stimulation mit TNF- α und IL-1 β bei A549 gezeigt wurde (Koyama et al., 2002), an den Epithelzell-Linien NCI H441 und NCI H820 überprüft.

Um mit der späteren Ko-Kultur vergleichbare Differenzierungsbedingungen zu erhalten, wurden Langzeitkulturen (10 Tage Vorkultur) auf 96 Well-Platten durchgeführt. Dabei wurden die Monokulturen von NCI H441 und NCI H820 wie bei der späteren Ko-Kultur ab Tag 3 der Kultivierung (Erreichen eines subkonfluenten Layers) bis zum Tag 10 mit und ohne 1 μ M Dexamethason in Ko-Kulturmedium kultiviert. Am Tag 10 der Kultivierung wurde der Einfluss einer 24-stündigen Stimulation mit LPS aus E.coli (1 μ g/ml) und den „early response“ Zytokinen TNF- α (300 U/ml) und IL-1 β (100 U/ml) auf die Expression von VEGF untersucht. Die Langzeitkultur mit 1 μ M Dexamethason reduziert bei NCI H441 und NCI H820 deutlich die Freisetzung von VEGF gegenüber der unbehandelten Kontrolle (Abb. 33). Während die basale Freisetzung von VEGF für unbehandelte NCI H441 nach 11 Tagen in Kultur durch Dexamethason-Zugabe von 9626,7 \pm 1014,4 pg/cm² auf 623,8 \pm 98,3 pg/cm² auf ca. 1/15 reduziert wurde, wurde die gering basale Freisetzung von 921,2 \pm 171,4 pg/cm² VEGF bei unbehandelten NCI H820 auf 453,6 \pm 30,2 pg/cm² auf die Hälfte reduziert. NCI H820 reagierten auf Stimulation mit IL-1 β (100 U/ml) mit einer 1,8-2,6fachen Erhöhung der VEGF-Freisetzung auf 1691,1 \pm 18,8 pg/cm² ohne und 1203,8 \pm 261,9 pg/cm² mit Dexamethason. NCI H441 zeigten keine Veränderung der VEGF Freisetzung nach Stimulation.

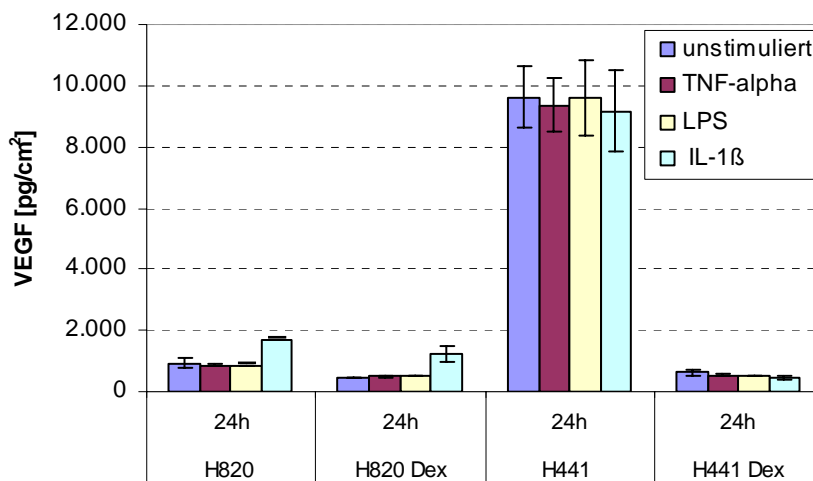


Abb. 33 Freisetzung von VEGF bei den Zell-Linien NCI H441 und NCI H820 mit und ohne Dexamethason. Konzentration von VEGF im Mediumüberstand von NCI H820 (P18) und NCI H441 (P11) nach 11-tägiger Kultivierung ohne bzw. mit 1 μ M Dexamethason in Ko-Kulturmedium und anschließender 24-stündiger Inkubation ohne Stimulanz bzw. mit TNF- α (300 U/ml), LPS (1 μ g/ml) sowie IL-1 β (100 U/ml). Mittelwert \pm SD, n=4. Sowohl mit als auch ohne Dexamethason löste IL-1 β (100 U/ml) bei NCI H820 eine erhöhte VEGF-Freisetzung aus. Durch Zugabe von 1 μ M Dexamethason für 11 Tage wurde die Freisetzung von VEGF bei NCI H441 auf ca. 1/15 reduziert, die gering basale VEGF-Freisetzung bei NCI H820 konnte auf die Hälfte reduziert werden.

3.4.3.3 Expression von Differenzierungsmarkern im Verlauf der Kultur mit Dexamethason

Die Expression von Differenzierungsmarkern im Verlauf der Kultur mit Dexamethason wurde an Ko-Kulturen von Epithel- und Endothelzell-Linien mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen (siehe Kap. 3.8).

Weiterhin wurde die mRNA-Expression der ATII-Marker SP-C und SP-D ohne und nach Zugabe von Dexamethason (1 μ M) für 5 Tage bei den epithelialen Zell-Linien A549 (Abb. 34, Linie 4 und 5), NCI H441 (Abb. 34, Linie 6 und 7) und NCI H820 (Abb. 34, Linie 8 und 9) mittels RT-PCR analysiert. Als positive Kontrollen wurde Lungenlysate und zwei Isolate von primären hATII Zellen nach 48h und 5d in Kultur (Abb. 34, Linie 1, 2 bzw. 3) eingesetzt. mRNA von Lungenfibroblasten, die keinen der untersuchten Marker exprimieren, wurde als negative Kontrolle für eine korrekt durchgeführte Amplifikation bei der RT-PCR verwendet (Abb. 34, Linie 10). Als weitere negative Kontrolle wurde bei einem Ansatz statt cDNA aqua dest. eingesetzt (Abb. 34, Linie 11). Um einen Vergleich aller Proben durchführen zu können, wurden gleiche Mengen cDNA in die PCR eingesetzt. Der Nachweis des 'housekeeping' Gens Aktin diente als Kontrolle für den Einsatz gleicher Mengen cDNA in die PCR.

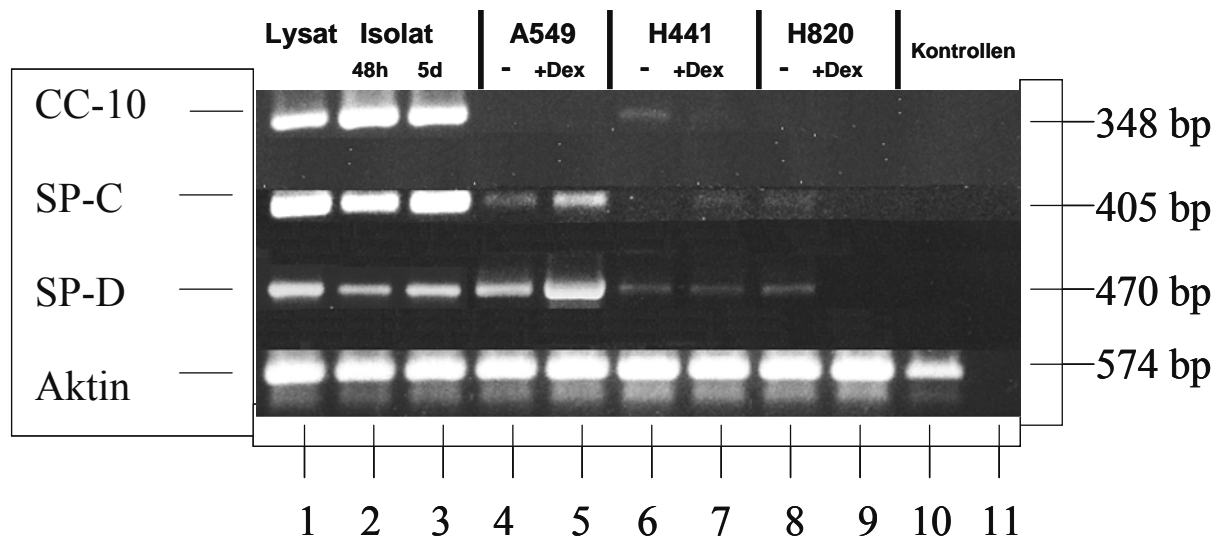


Abb. 34 Nachweis der mRNA-Expression von CC-10, SP-C und SP-D bei A549, NCI H441 und NCI H820 mit und ohne Dexamethason mittels RT-PCR. RT-PCR für CC-10, SP-C, SP-D und Aktin bei Lungenlysate (Linie 1), Zellisolaten nach 48h (Linie 2) und 5 Tagen (Linie 3) in Kultur sowie bei den Zell-Linien: A549 in MCDB 131, 5% FKS, bFGF/Heparin ohne und mit Dexamethason (1 μ M) (Linie 4 bzw. 5), NCI H441 in RPMI 10% FKS ohne und mit Dexamethason (1 μ M) (Linie 6 bzw. 7), NCI H820 in MCDB 131, 5% FKS, bFGF/Heparin ohne und mit Dexamethason (1 μ M) (Linie 8 bzw. 9) und als negative Kontrollen Fibroblasten (Linie 10) bzw. aqua dest. (Linie 11). 1 μ M Dexamethason steigerte die Expression der SP-C mRNA bei A549 und NCI H441 und reduzierte die Expression der CC-10 mRNA bei NCI H441. Bei A549 und NCI H441 wurden durch Zugabe von Dexamethason Merkmale des ATII Phänotyps verstärkt.

Wie Abbildung 34 zeigt, konnte eine mRNA-Expression von beiden Surfactant-Proteinen und CC-10 in Lungenlysate und bei den beiden ungetrennten Primärisolaten von hATII Zellen nachgewiesen werden. Bis auf die Zell-Linie NCI H441 ohne Dexamethason (Abb. 34, Linie 6) zeigte

keine der epithelialen Zell-Linien eine mRNA-Expression des Clara-Zell-Markers CC-10. Eine Expression von SP-C mRNA wurde mit Ausnahme der Dexamethason-behandelten NCI H820 für A549, NCI H441 und NCI H820 nachgewiesen. Die Zugabe von Dexamethason (1 μ M) für 5 Tage bewirkte eine Erhöhung der Expression von SP-D mRNA bei A549. Ebenfalls wurde die Expression von SP-C mRNA bei A549 deutlich gesteigert und die Expression der SP-C mRNA bei NCI H441 leicht erhöht. Gleichzeitig zur Steigerung der Expression der SP-C mRNA war die Expression der CC-10 mRNA bei Dexamethason-behandelten NCI H441 nicht mehr nachweisbar.

3.5 Vergleichende Untersuchungen der Epithelzellen in Mono-Kultur: Stimulation mit Zytokinen und LPS

3.5.1 Expression von Zelladhäsionsmolekülen (Cell Adhesion Molecules, CAMs)

Zelladhäsionsmoleküle auf der Zelloberfläche von Endothel- und Epithelzellen wie ICAM-1 und VCAM-1 dienen der Interaktion mit Leukozyten und sind somit für die Vermittlung inflammatorischer Immunantworten notwendig. Eine konstitutive Expression von ICAM-1 ist für Alveolarepithelzellen vom Typ I *in situ* beschrieben, während unterschiedliche Publikationen die Expression von ICAM-1 und VCAM-1 bei kultivierten Alveolarepithelzellen vom Typ II kontrovers diskutiert wird.

Um die Expression der Zelladhäsionsmoleküle (CAMs) ICAM-1 und VCAM-1 zu induzieren, wurden die Zellen für unterschiedliche Zeiten mit LPS (1 μ g/ml) und den „early response“ Zytokinen TNF- α (300 U/ml) und IL-1 β (100 U/ml) stimuliert. Als hATII Zellen wurden passagierte hATII* in zweiter Passage (P2) eingesetzt, da die hATII* für die spätere Ko-Kultur mit HPMEC ebenfalls in P2 eingesetzt werden sollten. Dabei wurden fibroblastenfreie CD44v6⁺ hATII* in serumfreiem AEGM untersucht, um den hATII-Phänotyp möglichst lange zu erhalten. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse von Einzelexperimenten mit einer Anzahl von n=4 Einzelwells einer 96-Well Platte.

3.5.1.1 Einfluss von Serum und Dexamethason auf die Expression von ICAM-1 bei hATII*

Die Kultivierung mit FKS fördert die Transdifferenzierung von hATII Zellen zu ATI-ähnlichen Zellen. Um den Einfluss von FKS auf die ICAM-1-Expression von hATII* in zweiter Passage zu untersuchen, wurden die Zellen zunächst in serumfreiem AEGM kultiviert und 2d vor der Stimulierung auf serumhaltiges Ko-Kulturmedium umgestellt. Außer einer differenzierungsfördernden Wirkung auf verschiedenste Zellen, wie Alveolarepithelzellen (Gonzales et al., 2002), besitzt Dexamethason eine allgemeine immunsuppressive Wirkung auf verschiedenste Zelltypen. Daher wurde in einem weiteren Versuch der Einfluss von FKS und Dexamethason auf die Stimulierbarkeit der hATII* in Langzeitkultur in serumfreiem AEGM Medium untersucht. Die Zellen wurden dazu mit verschiedenen Serumkonzentrationen mit und ohne 1 μ M Dexamethason für 10 Tage auf 96-Well Platten vorkultiviert und anschließend stimuliert.

ICAM-1-Expression der unstimulierten Kontrolle war durch die 2-tägige Vorkultivierung in Ko-Kulturmedium im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle in serumfreiem AEGM Medium um 5 bis 10fach erhöht (Abb. 35 verglichen mit Abb. 36). Desweiteren konnte in Ko-Kulturmedium kein

signifikanter Unterschied zwischen der ICAM-1-Expression der unstimulierten Kontrolle und der LPS (1 µg/ml), TNF-α (300 U/ml) oder IL-1β (100 U/ml) stimulierten Proben gemessen werden (Abb. 36). Demgegenüber wurde die ICAM-1-Expression der hATII* in serumfreiem AEGM mit TNF-α nach 24 h und 48 h deutlich erhöht (Abb. 35). Abbildung 35 stellt einen Spender dar, der auf eine Stimulation mit 100 U/ml IL-1β keine Erhöhung der Expression von ICAM-1 zeigte.

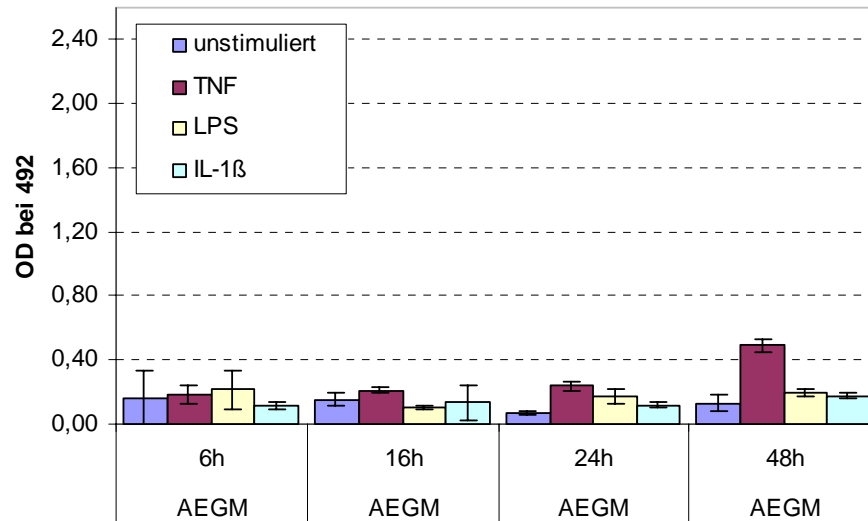


Abb. 35 Expression von ICAM-1 bei hATII* nach Stimulation in serumfreiem AEGM Medium. ICAM-Expression bei CD44v6⁺ hATII* (P2) nach 6, 16, 24 bzw 48-stündiger Inkubation in AEGM ohne Stimulanz bzw. mit TNF-α (300 U/ml), LPS (1µg/ml) sowie IL-1β (100 U/ml). Mittelwert ± SD, n=4, (Vorkultur 2d). TNF-α (300 U/m) erhöhte die ICAM-1-Expression der hATII* in serumfreiem AEGM nach 24 h und 48 h signifikant.

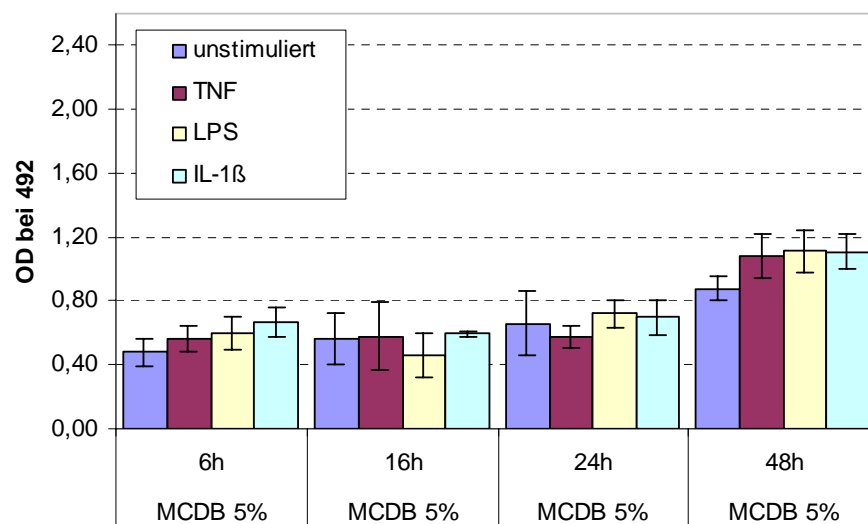


Abb. 36 Expression von ICAM-1 bei hATII* nach Stimulation in Ko-Kulturmedium. ICAM-Expression bei CD44v6⁺ hATII* (P2) nach 6, 16, 24 bzw 48-stündiger Inkubation in MCDB 131, 5% FKS, bFGF/Heparin ohne Stimulanz bzw. mit TNF-α (300 U/ml), LPS (1µg/ml) sowie IL-1β (100 U/ml). Mittelwert ± SD, n=4, (Vorkultur 2d). In serumhaltigem Ko-Kulturmedium wurde die ICAM-Expression der hATII* durch keines der Stimulanzen signifikant im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle erhöht.

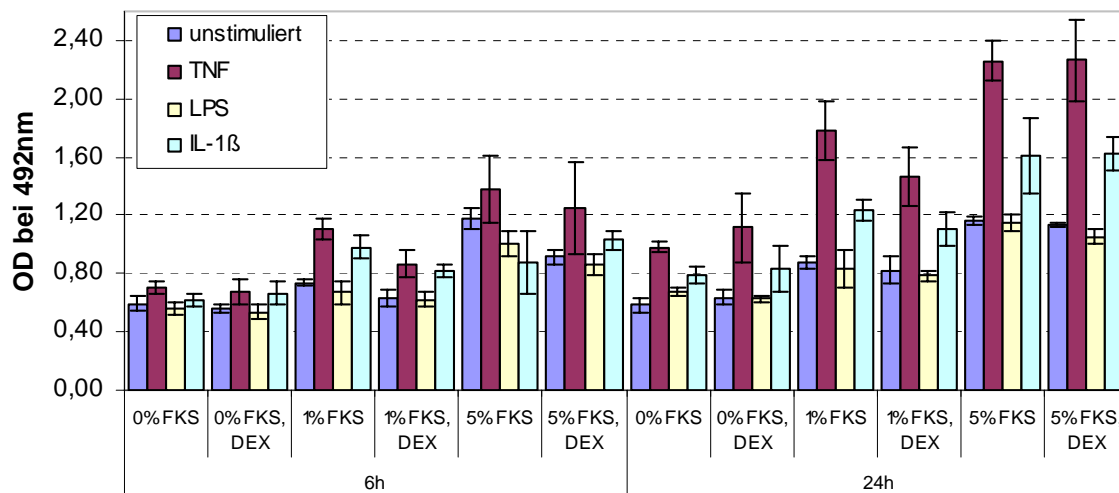


Abb. 37 Expression von ICAM-1 bei hATII* nach Stimulation in AEGM mit verschiedenen Serumkonzentrationen und Dexamethason. ICAM-Expression bei CD44v6⁺ hATII* (P2) nach 6 bzw. 24-stündiger Inkubation in AEGM ohne Stimulanz bzw. mit TNF- α (300 U/ml), LPS (1 μ g/ml) sowie IL-1 β (100 U/ml). Mittelwert \pm SD, n=4, (Vorkultur 11d ohne FKS (0%) bzw. mit 1% oder 5% FKS ohne und mit 1 μ M Dexamethason). Trotz Zugabe von Serum und Dexamethason wurde die Expression von ICAM-1 bei hATII* in AEGM nach Stimulation mit TNF- α (300 U/ml) und IL-1 β (100 U/ml) in AEGM-Medium signifikant gegenüber der unstimulierten Kontrolle gesteigert.

Für Langzeitkulturen (10 Tage Vorkultur auf 96-Well Platten) in AEGM mit unterschiedlicher FKS-Konzentration (0%, 1% und 5%) zeigte sich eine von der Serumkonzentration abhängige Zunahme von ICAM-1 für die unstimulierte Kontrolle (Abb. 37). Unabhängig von der Serum-Zugabe wurde die ICAM-1-Expression nach einer Stimulation von 6 bzw. 24 h mit LPS (1 μ g/ml) gegenüber der unstimulierten Kontrolle nicht erhöht. Die höchste ICAM-1 Expression wurde durch TNF- α (300 U/ml) nach 24h in AEGM mit 5% FKS induziert. Eine Vorkultivierung in Medium mit 1 μ M Dexamethason hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Stimulierbarkeit von ICAM-1 bei CD44v6⁺ hATII* in zweiter Passage.

3.5.1.2 Zeitverlauf der ICAM-1 und VCAM-1-Expression nach Stimulation

Um die immunmodulatorischen Eigenschaften der eingesetzten Zell-Linien mit denen der isolierten primären Alveoloarepithelzellen vom Typ II zu charakterisieren, wurde die Induzierbarkeit der Zelladhäsionsmoleküle (CAMs) ICAM-1 und VCAM-1 vergleichend untersucht. Dabei wurden fibroblastenfreie CD44v6⁺ hATII* in serumfreiem AEGM eingesetzt, um den hATII-Phänotyp möglichst lange zu erhalten. Abbildung 38-42 zeigen die zeitabhängige Steigerung der ICAM-1-Expression bei A549, hATII*, NCI H441 und NCI H820. Eine Stimulation mit TNF- α für 6-48 h führte für A549, hATII* und NCI H441 zu einer Zunahme von ICAM-1. Während A549 ICAM-1 nicht konstitutiv bildeten (Abb. 38), war für unstimulierte NCI H441 (Abb. 40) und NCI H820 (Abb. 42) unter gleichen Kulturbedingungen eine hohe konstitutive ICAM-1-Expression messbar. Auch hATII* exprimierten eine geringe Menge ICAM-1 konstitutiv (Abb. 39), die

Expression (rel. Einheit als Optische Dichte (OD) bei 492 nm) war jedoch 8-10mal geringer als die von NCI H441 (Abb. 40) und NCI H820 (Abb. 41 und 42).

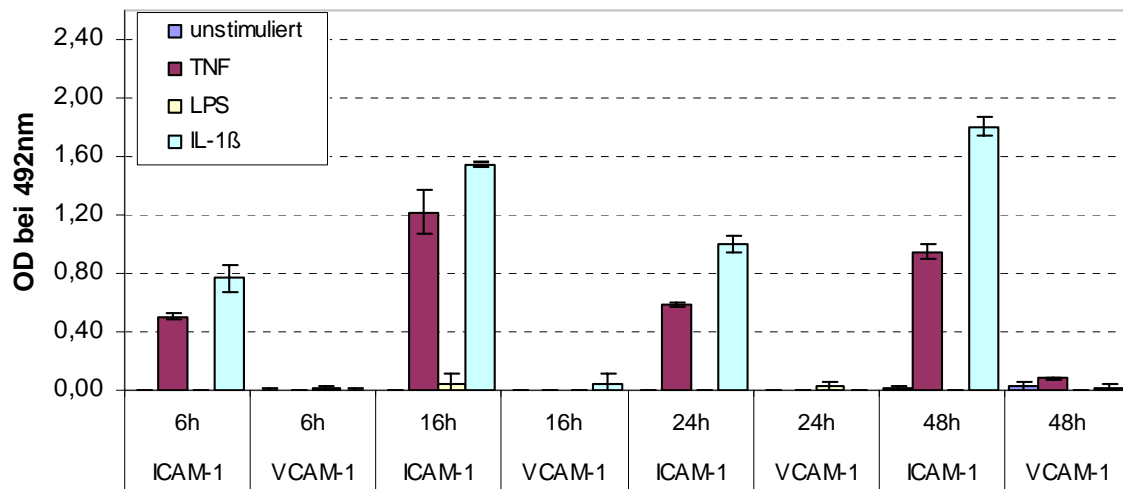


Abb. 38 Expression von ICAM-1 und VCAM-1 bei A549 nach Stimulation in Ko-Kulturmedium. ICAM-1 und VCAM-1-Expression bei A549 (P25) nach 6, 16, 24 bzw 48-stündiger Inkubation in MCDB 131, 5% FKS, bFGF/Heparin ohne Stimulanz bzw. mit TNF- α (300 U/ml), LPS (1 μ g/ml) sowie IL-1 β (100 U/ml). Mittelwert \pm SD. n=4 (Vorkultur 1d). Eine Stimulation mit TNF- α (300 U/ml) und IL-1 β (100 U/ml) für 6-48h führte zu einer signifikanten Zunahme der Expression von ICAM-1 bei A549 Zellen.

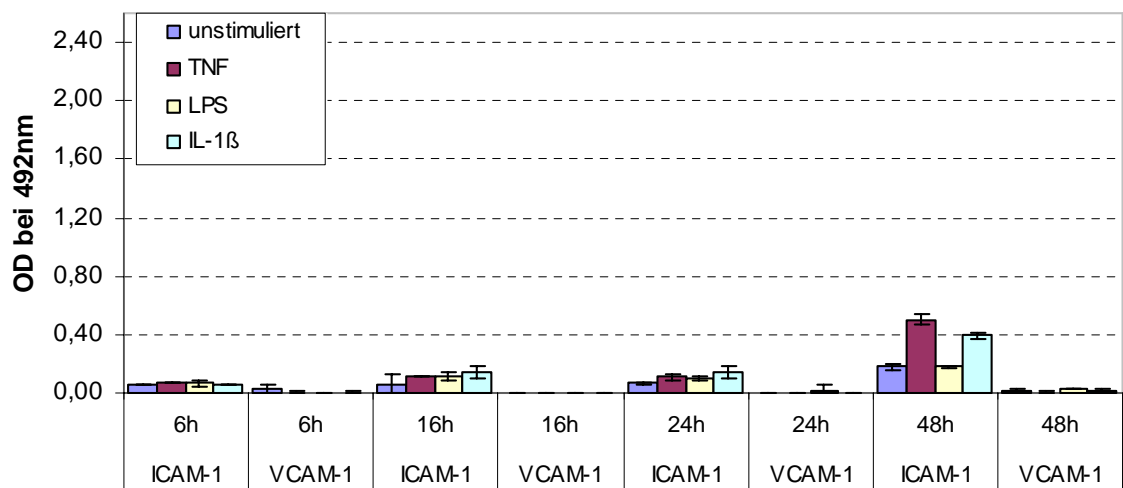


Abb. 39 Expression von ICAM-1 und VCAM-1 bei hATII* nach Stimulation in serumfreiem AEGM Medium. ICAM-1 und VCAM-1-Expression bei CD44v6⁺ hATII* (P2) nach 6, 16, 24 bzw 48-stündiger Inkubation in AEGM ohne Stimulanz bzw. mit TNF- α (300 U/ml), LPS (1 μ g/ml) sowie IL-1 β (100 U/ml). Mittelwert \pm SD. n=4 (Vorkultur 1d). Eine Stimulation mit TNF- α (300 U/ml) und IL-1 β (100 U/ml) für 6-48h führte zu einer signifikanten Zunahme der Expression von ICAM-1 bei hATII* nach 48h.

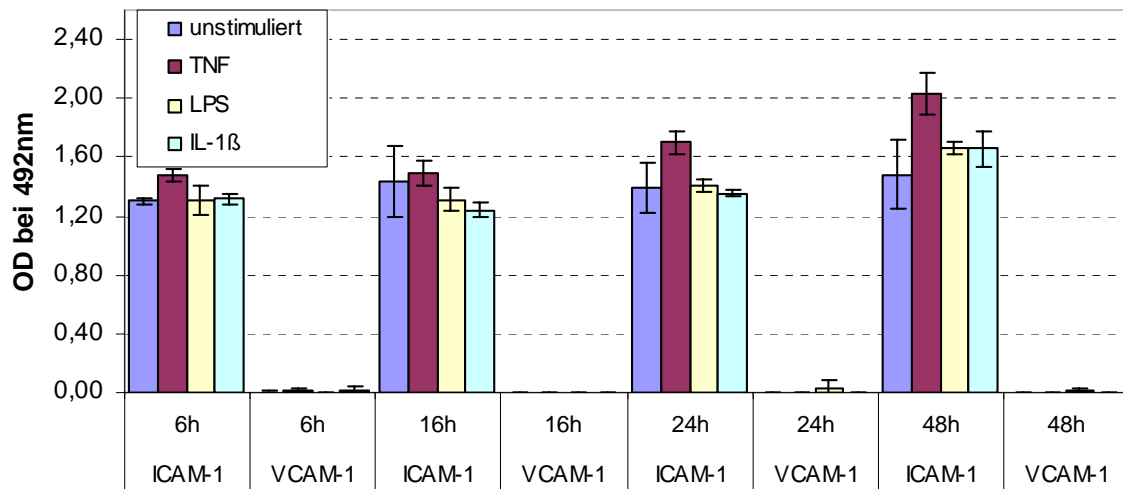


Abb. 40 Expression von ICAM-1 und VCAM-1 bei NCI H441 nach Stimulation in Ko-Kulturmedium. ICAM-1 und VCAM-1-Expression bei NCI H441 (p8) nach 6, 16, 24 bzw 48-stündiger Inkubation in MCDB 131, 5% FKS, bFGF/Heparin ohne Stimulanz bzw. mit TNF- α (300 U/ml), LPS (1 μ g/ml) sowie IL-1 β (100 U/ml). Mittelwert \pm SD. n=4 (Vorkultur 1d). Eine Stimulation mit TNF- α (300 U/ml) für 6-48h führte nach 24-48h zu einer signifikanten Zunahme der Expression von ICAM-1 bei NCI H441 Zellen.

Die Expression von ICAM-1 wurde bei A549 (Abb. 38), hATII* (Abb. 39) und NCI H820 (Abb. 41) durch die eingesetzten Konzentrationen der Zytokine TNF- α und IL-1 β induziert. Demgegenüber wurde bei NCI H441 nur durch TNF- α eine leichte Erhöhung der ICAM-1-Expression hervorgerufen, während die Stimulation mit 100 U/ml IL-1 β keinen steigernden Effekt auf die ICAM-1 Expression der NCI H441 zeigte (Abb. 40). Für NCI H820 waren in Abhängigkeit vom Kulturmedium deutliche Unterschiede in der Expression von ICAM-1 feststellbar (Abb. 41 und Abb. 42). Die in serumfreiem Medium bereits hohe konstitutive Expression von ICAM-1 konnte in serumhaltigem Ko-Kulturmedium deutlich gesteigert werden. Eine signifikante Zunahme von ICAM-1 war nach Stimulation mit 100 U/ml IL-1 β messbar, 300 U/ml TNF- α induzierten erst nach 24h in serumfreiem Medium einen leichten Anstieg von ICAM-1 bei NCI H820. 1 μ g/ml LPS konnte innerhalb des Messzeitraums von 6, 16, 24 und 48h bei keiner der untersuchten Zellen eine Expression von ICAM-1 induzieren.

Die Expression von VCAM-1 wurde durch keine der eingesetzten Stimulanzen innerhalb des Messzeitraums von 6, 16, 24 und 48h induziert, nachgewiesen durch CAM-EIA.

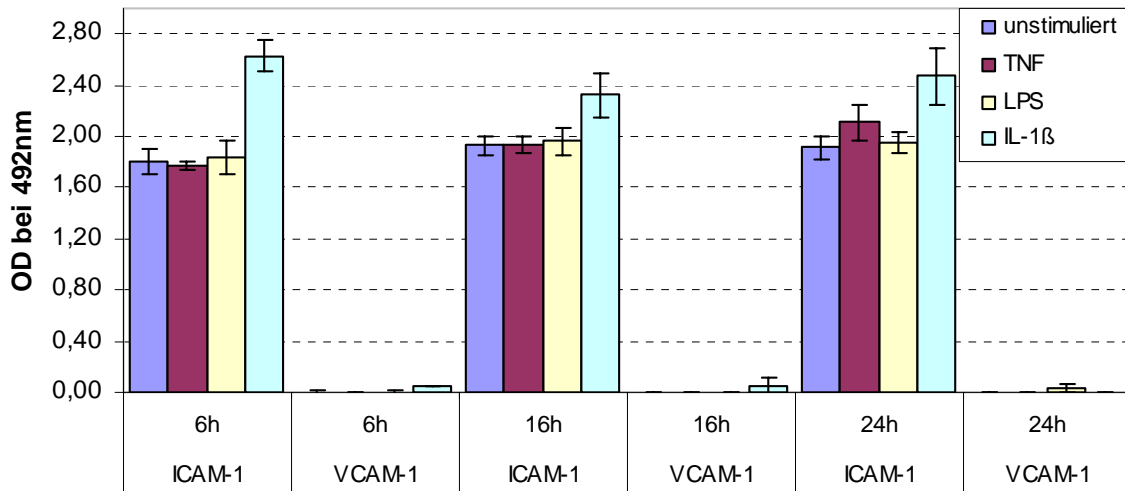


Abb. 41 Expression von ICAM-1 und VCAM-1 bei NCI H820 nach Stimulation in serumfreiem AEGM. ICAM-1 und VCAM-1-Expression bei NCI H820 (P23) nach 6, 16 bzw 24-stündiger Inkubation in AEGM ohne Stimulanz bzw. mit TNF- α (300 U/ml), LPS (1 μ g/ml) sowie IL-1 β (100 U/ml). Mittelwert \pm SD. n=4 (Vorkultur 2d). Eine Stimulation mit IL-1 β (100 U/ml) für 6-24h führte zu einer deutlichen Zunahme der Expression von ICAM-1 bei NCI H820 Zellen in serumfreiem AEGM. Die Stimulation mit TNF- α (300 U/ml) zeigte erst nach 24h eine signifikante Zunahme der ICAM-Expression.

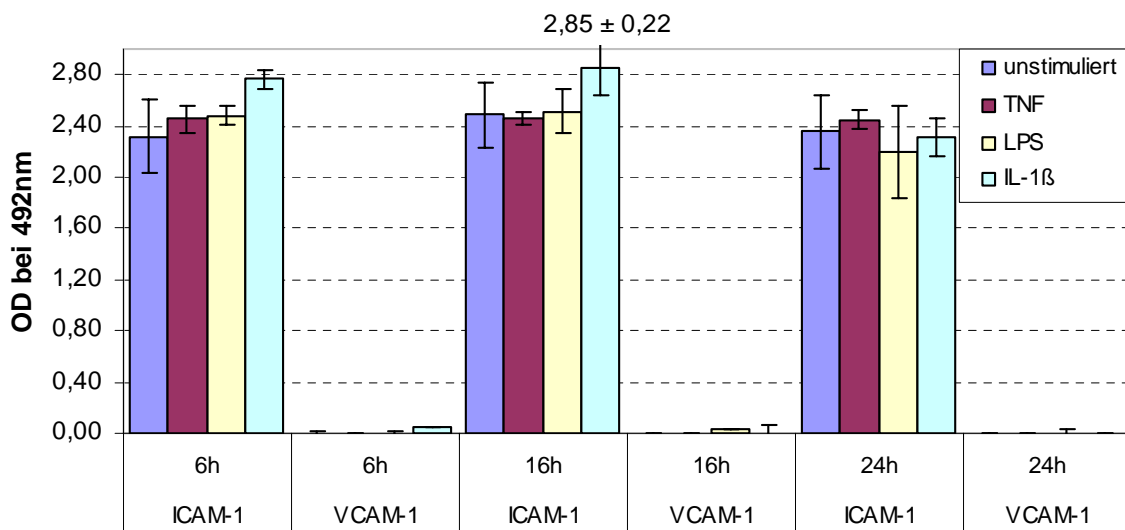


Abb. 42 Expression von ICAM-1 und VCAM-1 bei NCI H820 nach Stimulation in Ko-Kulturmedium. ICAM-1 und VCAM-1-Expression bei NCI H820 (P23) nach 6, 16 bzw 24-stündiger Inkubation in Ko-Kulturmedium ohne Stimulanz bzw. mit TNF- α (300 U/ml), LPS (1 μ g/ml) sowie IL-1 β (100 U/ml). Mittelwert \pm SD. n=4 (Vorkultur 2d). Eine Stimulation mit IL-1 β (100 U/ml) für 6-24h führte nach 6-16h zu einer signifikanten Zunahme der Expression von ICAM-1 bei NCI H820 Zellen in serumhaltigem Ko-Kulturmedium.

3.5.1.4 Expression von ICAM-1 bei Kultivierung in verschiedenen Medien

Da für NCI H441 in der späteren Ko-Kultur (siehe Kap. 3.8.1), eine Umstellung vom Ko-Kulturmedium (MCDB 131 mit 5% FKS, bFGF (2,5 ng) und Heparin (10 µg/ml)) auf RPMI mit 10% FKS erfolgte, wurde die Expression von ICAM-1 nach o. g. Stimulation in beiden Medien verglichen. NCI H441 zeigten im CAM-EIA, unabhängig vom Kulturmedium, eine konstitutive Expression von ICAM-1, die durch TNF- α erhöht werden konnte (Abb. 44).

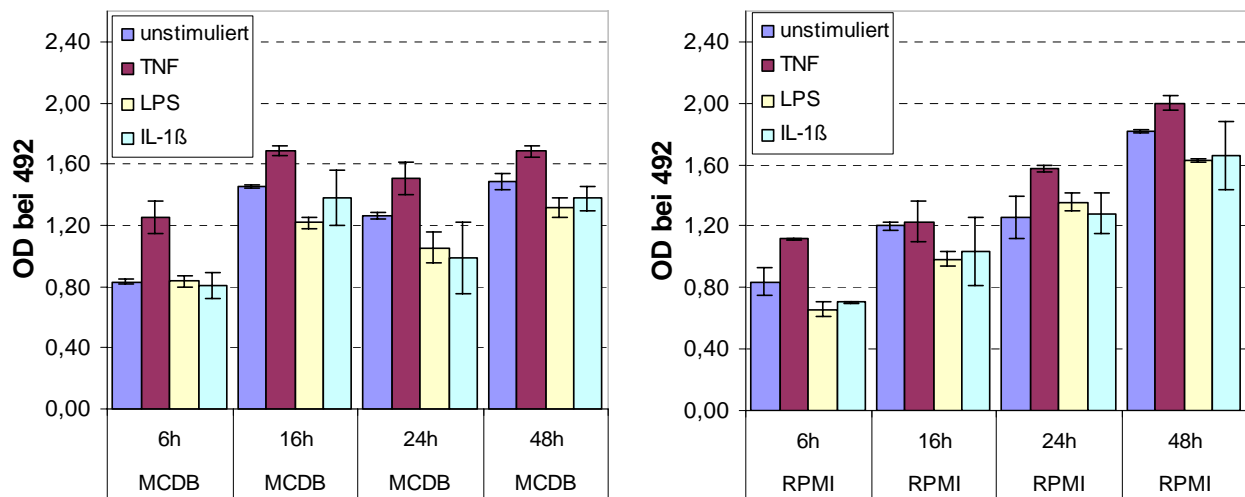


Abb. 44 Expression von ICAM-1 bei NCI H441 nach Stimulation in Ko-Kulturmedium bzw. RPMI 10% FKS. ICAM-Expression bei NCI H441 (P10) nach 6, 16, 24 bzw 48-stündiger Inkubation in MCDB 131, 5% FKS, bFGF/Heparin (links) bzw. RPMI 1640, 10% FKS (rechts) ohne Stimulanz bzw. mit TNF- α (300 U/ml), LPS (1 µg/ml) sowie IL-1 β (100 U/ml). Mittelwert \pm SD, n=4, (Vorkultur 2d). Nach Stimulation mit TNF- α (300 U/ml) für 6-48h nahm sowohl in Ko-Kulturmedium als auch in RPMI mit 10% FKS die Expression von ICAM-1 signifikant zu.

3.5.2 Freisetzung sekundärer inflammatorischer Mediatoren

Die Quantifizierung der basalen sowie stimulationsinduzierten Freisetzung des proinflammatorischen Zytokins IL-6 sowie der Chemokine IL-8, RANTES (regulated upon activation normal T cell expressed and presumably secreted) und MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) in den Mediumüberstand diente der weiteren Charakterisierung der CD44v6⁺ hATII*. Die Freisetzung dieser sekundären inflammatorischen Mediatoren wurden vergleichend mit A549, NCI H441 und NCI H820 nach Stimulation mit LPS (1 µg/ml), TNF- α (300 U/ml) und IL-1 β (100 U/ml) analysiert.

Für NCI H441 und NCI H820 wurde bei der späteren Ko-Kultur der Einsatz von Dexamethason zur Differenzierung notwendig. Außer der Unterstützung der Ausbildung einer epithelialen bzw. endothelialen Barriere hat Dexamethason eine immunsuppressive Wirkung, es hemmt die Aktivierung immunaktiver Zellen durch Zytokine. Daher wurde ebenfalls der Einfluss von Dexamethason auf die Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine IL-6, IL-8, RANTES und MCP-1 bei den Zell-Linien NCI H441 und NCI H820 in Langzeitkultur mit Dexamethason (10 Tage Vorkultur in Medium mit 1 µM Dexamethason) nach Stimulation untersucht.

IL-6 wurde von unstimulierten A549 nicht freigesetzt. Seine Freisetzung wurde nach 24-stündiger Stimulation durch TNF- α (300 U/ml) leicht und IL-1 β (100 U/ml) auf 95 ± 8 pg IL-6 pro cm^2 konfluentem Zellrasen induziert (Abb. 45 links). Die basale Freisetzung von IL-6 variierte innerhalb der verschiedenen Isolate von CD44v6⁺ hATII*. Für hATII* wurden eine geringe basale IL-6 Freisetzung von 5 pg/cm² (andere Isolate bis 47 pg/cm²) nach 6h und 34 pg/cm² (andere Isolate bis 234 pg/cm²) nach 24h für die unstimulierten Kontrollen nachgewiesen (Abb. 45 rechts). Hier wurde die Freisetzung von IL-6 nach 24h in den Mediumüberstand deutlich durch TNF- α (auf 87 ± 1 pg/cm²) sowie IL-1 β (auf 124 ± 7 pg/cm²) erhöht.

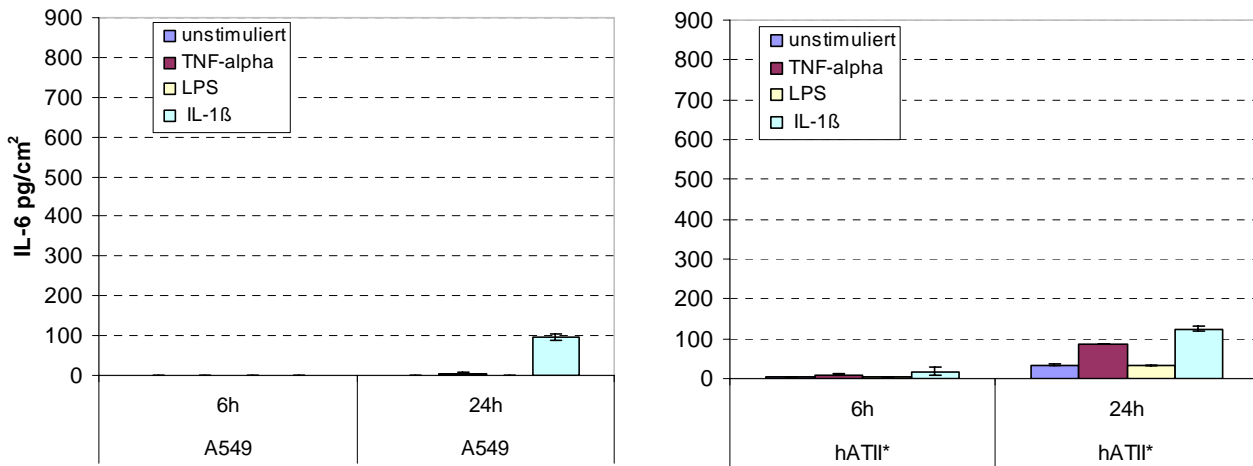


Abb. 45 Freisetzung von IL-6 nach Stimulation bei A549 bzw. hATII*. Konzentration von IL-6 im Mediumüberstand von A549 (P11) nach 6 bzw 24-stündiger Inkubation in MCDB 131, 5% FKS, bFGF/Heparin (links) bzw. von CD44v6⁺ ATII* (P2) nach 6 bzw 24-stündiger Inkubation in AEGM (rechts) ohne Stimulanz bzw. mit TNF- α (300 U/ml), LPS (1 μ g/ml) sowie IL-1 β (100 U/ml). Mittelwert \pm SD, n=4. A549 setzten nach 24-stündiger Stimulation mit IL-1 β vermehrt IL-6 frei. CD44v6⁺ ATII* (P2) zeigten nach 24-stündiger Stimulation mit TNF- α und mit IL-1 β eine signifikante Zunahme der IL-6 Konzentration pro cm^2 konfluenter Zellrasen.

Nicht stimulierte NCI H441 zeigten nach 24h eine geringe basale Freisetzung von 32 ± 3 pg/cm² IL-6. Diese wurde durch Stimulation nach 24h nicht erhöht (Abb. 46 links). Die Zugabe von Dexamethason hatte keinen Einfluss auf die Expression von IL-6 bei NCI H441 (Abb. 46 links). Die höchste Freisetzung von IL-6 innerhalb der untersuchten Epithelzellen wurde nach 24-stündiger Stimulation mit IL-1 β (100 U/ml) mit 893 ± 3 pg/cm² bei NCI H820 gemessen. Ohne Dexamethason wurde für die unstimulierte Kontrolle eine Konzentration von 48 ± 7 pg/cm² IL-6 nach 24h ermittelt, die bei Zugabe von Dexamethason (Dex) auf 38 ± 3 pg/cm² reduziert war (Abb. 46 rechts). Auch die durch TNF- α (300 U/ml) und IL-1 β (100 U/ml) induzierte Freisetzung von IL-6 war bei Dexamethason-behandelten NCI H820 verglichen mit unbehandelten Zellen deutlich erniedrigt. Die Zugabe von Dexamethason führte bei NCI H820 zu einer um ca. die Hälfte reduzierten Freisetzung von IL-6 nach Stimulation mit TNF- α (300 U/ml) und IL-1 β (100 U/ml). Bei allen untersuchten Epithelzellen konnte eine Stimulation mit 1 μ g/ml LPS für 6h bzw. 24h keine gegenüber der Kontrolle erhöhte Freisetzung von IL-6 induzieren.

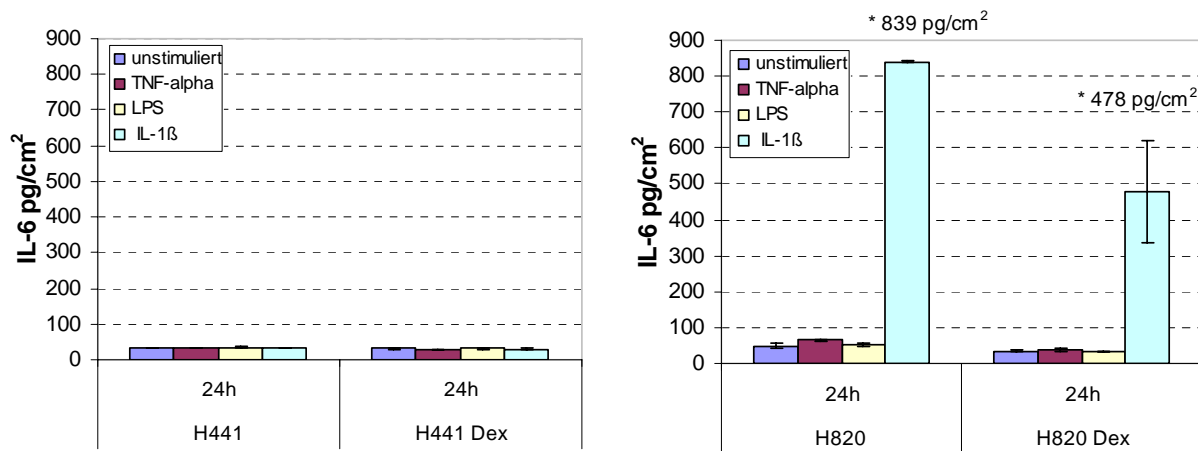


Abb. 46 Freisetzung von IL-6 nach Stimulation bei NCI H441 bzw. NCI H820 ohne und mit Dexamethason. Konzentration von IL-6 im Mediumüberstand von NCI H441 (P11) und NCI H820 (P18) nach 24-stündiger Inkubation ohne bzw. mit Dexamethason in MCDB 131, 5% FKS, bFGF/Heparin ohne Stimulanz bzw. mit TNF- α (300 U/ml), LPS (1 μ g/ml) sowie IL-1 β (100 U/ml). Mittelwert \pm SD, n=4. (*errechnete Konzentration außerhalb der Standardkurve des ELISA's). NCI H441 zeigten nach 24-stündiger Stimulation mit TNF- α , LPS sowie IL-1 β keine vermehrte Freisetzung von IL-6. Die durch TNF- α und IL-1 β induzierte Freisetzung von IL-6 war bei Dexamethason-behandelten NCI H820 verglichen mit unbehandelten Zellen deutlich um ca. die Hälfte erniedrigt.

Sowohl A549, NCI H441, NCI H820 als auch hATII* zeigten eine basale Freisetzung von IL-8 (Abb. 47-48), wobei Konzentrationen von 300-500 pg/cm² gemessen wurden. Auf die Expression von IL-8 hatte neben TNF- α (300 U/ml), das bei allen Zellen eine IL-8 Freisetzung auslöste, auch IL-1 β (100 U/ml) bei A549, NCI H820 und hATII* eine induzierende Wirkung. Die absoluten Werte der durch 24 h Stimulation mit TNF- α induzierten Freisetzung von IL-8 unterschieden sich stark innerhalb der Zell-Linien von 470 pg/cm² bei NCI H820 über 1047 pg/cm² bei hATII* und 2163 pg/cm² bei A549 bis 3776 pg/cm² bei NCI H441. NCI H441 reagierten auf IL-1 β einer Konzentration von 100 U/ml mit keiner gesteigerten Freisetzung von IL-8. Mit 12,5 ng/cm² bei NCI H820 (Abb. 48 rechts) konnte IL-1 β die stärkste IL-8-Freisetzung induzieren. Wie bei IL-6 bewirkte die Zugabe von Dexamethason zu den Zell-Linien NCI H441 bzw. NCI H820 eine gegenüber den unbehandelten Zellen eine auf 1/6 bzw. die Hälfte reduzierte Freisetzung von IL-8 nach Stimulation mit TNF- α (Abb. 48).

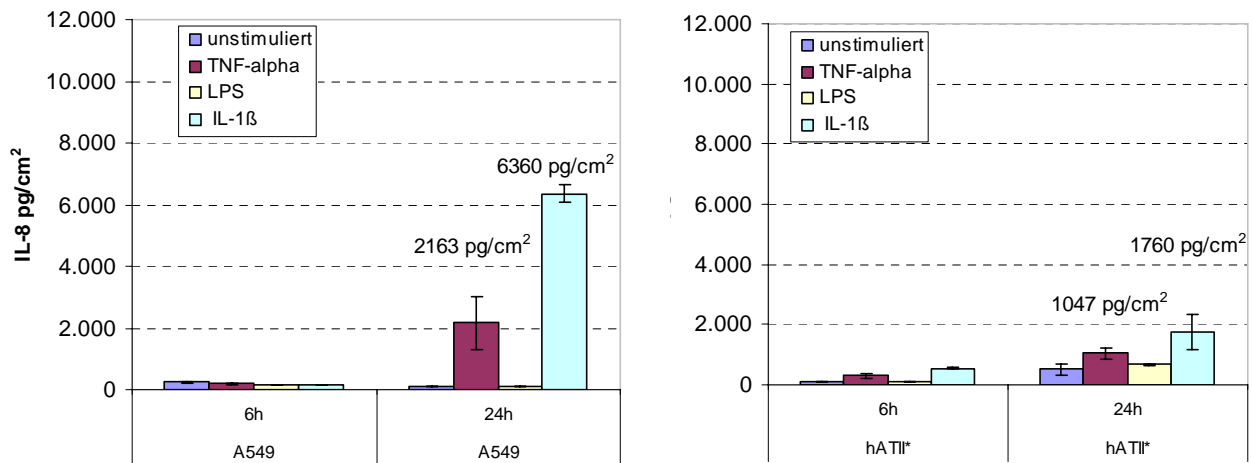


Abb. 47 Freisetzung von IL-8 nach Stimulation bei A549 bzw. hA11*. Konzentration von IL-8 im Mediumüberstand von A549 (P11) nach 6 bzw 24-stündiger Inkubation in MCDB 131, 5% FKS, bFGF/Heparin (links) bzw. von A11 (P2) nach 6 bzw 24-stündiger Inkubation in AEGM (rechts) ohne Stimulanz bzw. mit TNF- α (300 U/ml), LPS (1 μ g/ml) sowie IL-1 β (100 U/ml). Mittelwert \pm SD, n=4. (*errechnete Konzentration außerhalb der Standardkurve des ELISA's). A549 setzten nach 24-stündiger Stimulation mit TNF- α und IL-1 β vermehrt IL-8 frei. CD44v6⁺ A11* (P2) zeigten nach 6- und 24-stündiger Stimulation mit TNF- α und mit IL-1 β eine signifikante Zunahme der IL-8 Konzentration pro cm² konfluenten Zellrasen.

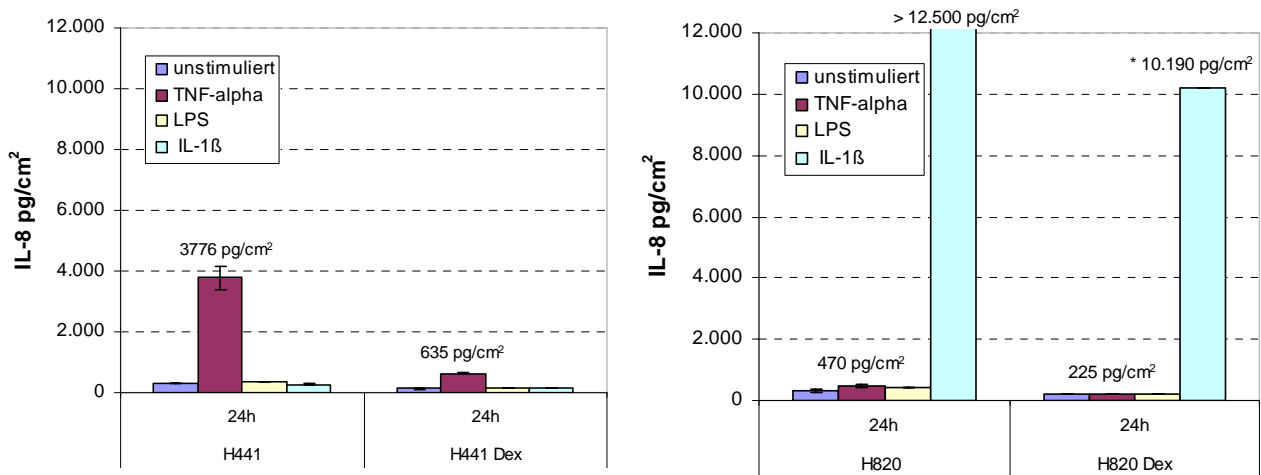


Abb. 48 Freisetzung von IL-8 nach Stimulation bei NCI H441 bzw. NCI H820 ohne und mit Dexamethason. Konzentration von IL-8 im Mediumüberstand von NCI H441 (P11) und NCI H820 (P18) nach 24-stündiger Inkubation ohne bzw. mit Dexamethason in MCDB 131, 5% FKS, bFGF/Heparin ohne Stimulanz bzw. mit TNF- α (300 U/ml), LPS (1 μ g/ml) sowie IL-1 β (100 U/ml). Mittelwert \pm SD, n=4. (*errechnete Konzentration außerhalb der Standardkurve des ELISA's). Die durch TNF- α induzierte Freisetzung von IL-8 war bei Dexamethason-behandelten NCI H441 auf 1/6 der Freisetzung der unbehandelten Zellen erniedrigt. Die durch TNF- α induzierte Freisetzung von IL-6 war bei Dexamethason-behandelten NCI H820 verglichen mit unbehandelten Zellen um ca. die Hälfte erniedrigt.

A549 (Abb. 49 links) und NCI H820 (Abb. 50 rechts) zeigten eine deutliche Steigerung der basalen Freisetzung von MCP-1 durch die Stimulation mit TNF- α und IL-1 β , wobei IL-1 β die stärkste Abgabe hervorrief. Bei NCI H820 führte außerdem eine Stimulation mit LPS (1 μ g/ml) zur Freisetzung von MCP-1, die mit 750 \pm 145 pg/cm² höher war als die durch TNF- α hervorgerufene Freisetzung von MCP-1 von 512 \pm 116 pg/cm². Die durch IL-1 β induzierte Freisetzung von MCP-1 bei NCI H820 konnte durch Zugabe von Dexamethason nicht signifikant reduziert werden, die durch LPS und TNF- α induzierte Abgabe von MCP-1 wurde nach Zugabe von Dexamethason jedoch auf ca. 1/3 reduziert (Abb. 50 rechts).

Die basale Freisetzung von MCP-1 bei CD44v6⁺ hATII* konnte durch Stimulation mit LPS und IL-1 β nach 6h leicht, aber nicht signifikant gesteigert werden. Bei NCI H441 löste die Stimulation mit TNF- α eine Freisetzung von 97 \pm 14 pg/cm² MCP-1 aus. Diese Menge an MCP-1 nach Stimulation mit TNF- α konnte auch nach Behandlung von NCI H441 mit Dexamethason gemessen werden (Abb. 50 links).

Die Freisetzung von RANTES wurde mit Hilfe der eingesetzten Stimulanzien nur bei A549 induziert (nicht gezeigt). Auch in serumhaltigem Medium (MCDB 131, 5% FKS, bFGF/Heparin) war keine Freisetzung von RANTES für CD44v6⁺ hATII* (P2) über einen Meßzeitraum von 48 h nachweisbar (nicht gezeigt).

Zusammenfassend zeigte keine der untersuchten epithelialen Zell-Linien ein den isolierten CD44v6⁺ hATII* in P2 identisches Expressionsmuster. Hier sollte beachtet werden, dass das Expressionsmuster bei hATII* in P2 für IL-6, IL-8 und MCP-1, wie für SP-C und TTF-1 schon gezeigt wurde, von dem der hATII Zellen in P0 bzw. *in situ* abweichen kann.

Im Vergleich zu CD44v6⁺ hATII* in P2 wurde die basale Freisetzung von IL-6 bei NCI H441 durch Stimulation mit 300 U/ml TNF- α und 100 U/ml IL-1 β nicht hoch reguliert. Weiter zeigten NCI H441 keine Reaktion auf die Stimulation mit IL-1 β einer Konzentration von 100 U/ml. Bei NCI H441 nach Stimulation mit TNF- α ähnelte die Expression der Zytokine IL-8 und MCP-1 und die fehlende Expression von RANTES der Reaktion der serumfrei kultivierten hATII* in P2.

Die fehlende Freisetzung von RANTES und das Expressionsmuster von IL-6 und IL-8 bei NCI H820 entsprach im Wesentlichen dem der CD44v6⁺ hATII* (P2) in serumhaltigem Medium. NCI H820 reagierten auf beide *early response* Zytokine und LPS ähnlich wie hATII* in serumhaltigem Medium, wobei die Reaktion auf IL-1 β bei NCI H820 wesentlich stärker war als die der hATII*. Im Unterschied zu CD44v6⁺ hATII* in P2 zeigten NCI H820 eine stark induzierbare Freisetzung (IL-1 β >LPS>TNF- α) von MCP-1.

Im Gegensatz zu CD44v6⁺ hATII* wurden die Zytokine IL-6 und IL-8 von A549 basal nicht freigesetzt. Obwohl sich A549 entsprechend hATII* mit 300 U/ml TNF- α und 100 U/ml IL-1 β stimulieren ließen, produzierten sie außer den Zytokinen IL-6 und IL-8 wie hATII* auch MCP-1 bzw. RANTES, die von CD44v6⁺ hATII* in P2 nur minimal (MCP-1) bzw. nicht produziert wurden (RANTES).

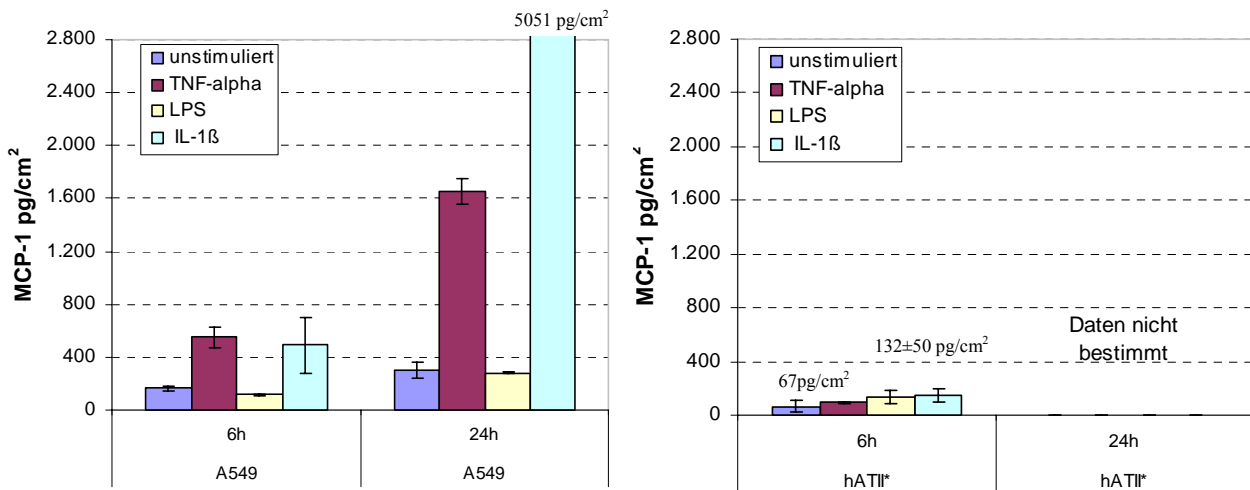


Abb. 49 Freisetzung von MCP-1 nach Stimulation bei A549 bzw. hATII*. Konzentration von MCP-1 im Mediumüberstand von A549 (P11) nach 6 bzw 24-stündiger Inkubation in MCDB 131, 5% FKS, bFGF/Heparin (links) bzw. von ATII (P2) nach 6 bzw 24-stündiger Inkubation in AEGM (rechts) ohne Stimulanz bzw. mit TNF-α (300 U/ml), LPS (1µg/ml) sowie IL-1β (100 U/ml). Mittelwert ± SD, n=4. (*errechnete Konzentration außerhalb der Standardkurve des ELISA's). A549 setzten nach 6- und 24-stündiger Stimulation mit TNF-α und IL-1β vermehrt MCP-1 frei. CD44v6⁺ ATII* (P2) zeigten nach 6-stündiger Stimulation mit LPS und mit IL-1β eine leichte, aber nicht signifikante Zunahme der MCP-1 Konzentration pro cm² konfluenter Zellrasen.

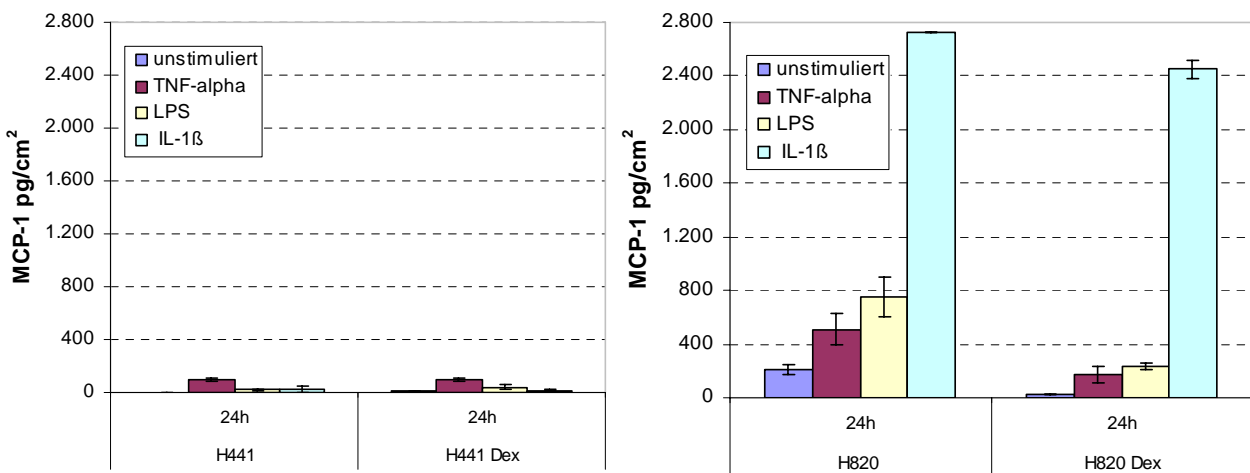


Abb. 50 Freisetzung von MCP-1 nach Stimulation bei NCI H441 bzw. NCI H820 ohne und mit Dexamethason. Konzentration von MCP-1 im Mediumüberstand von NCI H441 (P11) und NCI H820 (P18) nach 24-stündiger Inkubation ohne bzw. mit Dexamethason in MCDB 131, 5% FKS, bFGF/Heparin ohne Stimulanz bzw. mit TNF-α (300 U/ml), LPS (1µg/ml) sowie IL-1β (100 U/ml). Mittelwert ± SD, n=4. NCI H441 zeigten unabhängig von der Vorkultur mit Dexamethason nach 24-stündiger Stimulation mit TNF-α eine leicht erhöhte Freisetzung von MCP-1. Die durch IL-1β induzierte hohe Freisetzung von MCP-1 wurde durch Vorkultur mit Dexamethason nur leicht beeinflusst. Dagegen wurde die durch TNF-α und LPS induzierte Freisetzung von MCP-1 bei Dexamethason-behandelten NCI H820 deutlich auf ca. 1/3 der unbehandelten Zellen erniedrigt.

3.6 Vergleichende Untersuchungen der Endothelzellen in Mono-Kultur: Stimulation mit Zytokinen und LPS

3.6.1 Expression von Zelladhäsionsmolekülen (Cell Adhesion Molecules, CAMs)

3.6.1.1 Zeitverlauf der ICAM-1 und VCAM-1-Expression nach Stimulation (CAM-EIA)

Um die Eignung der Zell-Linie ISO-HAS-1 als Ersatz für primär isolierte HPMEC im späteren Ko-Kultur Modell zu prüfen, wurde die Induzierbarkeit der Zelladhäsionsmoleküle (CAMs) ICAM-1 und VCAM-1 sowie von E-Selektin vergleichend mit HPMEC untersucht. Dazu wurden die Zellen für unterschiedliche Zeiten mit LPS (1 µg/ml) und den „early response“ Zytokinen TNF-α (300 U/ml) und IL-1β (100 U/ml) stimuliert. Abbildung 51-52 zeigen die zeitabhängige Steigerung der Expression von ICAM-1 und VCAM-1 bei HPMEC und ISO-HAS-1. Über einen Zeitraum von 6-24 h wurde für TNF-α, LPS und IL-1β stimulierte HPMEC (Abb. 51) und ISO-HAS-1 (Abb. 52) eine Zunahme von ICAM-1 beobachtet.

VCAM-1 konnte bei 5 von 6 Isolaten von HPMEC durch alle eingesetzten Stimulanzen induziert werden, wobei die Expression über einen Zeitraum von 4-24h zunahm. ISO-HAS-1 zeigten dagegen nach 16-stündiger Stimulation mit TNF-α und IL-1β eine maximale Expression von VCAM-1 (Abb. 52). Das Verlaufsmuster der Expression von E-Selektin (Abb. 52) war bei der Zell-Linie ISO-HAS-1 dem der Primärzellen (HPMEC) ähnlich. Nach 4h Stimulation mit TNF-α war eine hohe E-Selektin-Expression mit einer Extinktion (OD bei 492 nm) von 1,8 bei HPMEC und 1,6 bei ISO-HAS-1 messbar, die dann nach 16 bis 24h langsam wieder abnahm. Die Primärzellen reagierten wesentlich empfindlicher auf LPS der Konzentration 1 µg/ml als ISO-HAS-1. Während bei HPMEC durch TNF-α und LPS eine ähnlich hohe Expression von ICAM-1 und E-Selektin ausgelöst wurde, war die durch LPS induzierte Reaktion der ISO-HAS-1 meist nur halb so stark wie die durch TNF-α ausgelöste Expression.

Hinsichtlich der Expressionsmuster von ICAM-1 und E-Selektin nach Stimulation eignet sich die endotheliale Zell-Linie ISO-HAS-1 als Modell für mikrovaskuläre Endothelzellen. Die Expression von VCAM-1 war jedoch wesentlich schwächer als bei den Primärzellen, obwohl eine Expression von VCAM-1 mRNA und deren deutliche Erhöhung bereits nach 6-stündiger Stimulation mit TNF-α mittels RT-PCR bei ISO-HAS-1 nachgewiesen wurde (siehe Kap 3.5.1.3). Weiter zeigten ISO-HAS-1 eine basale Expression von VCAM-1 mRNA bei Kultivierung auf Gewebekulturplastik, die einen inflammatorischen Phänotyp dieser Zelle darstellt. Durch Kultivierung auf Kollagen Typ I-beschichteten Kulturoberflächen, wie in der späteren Ko-Kultur, konnte diese basale Expression von VCAM-1 mRNA reduziert werden (siehe Kap. 3.5.1.3).

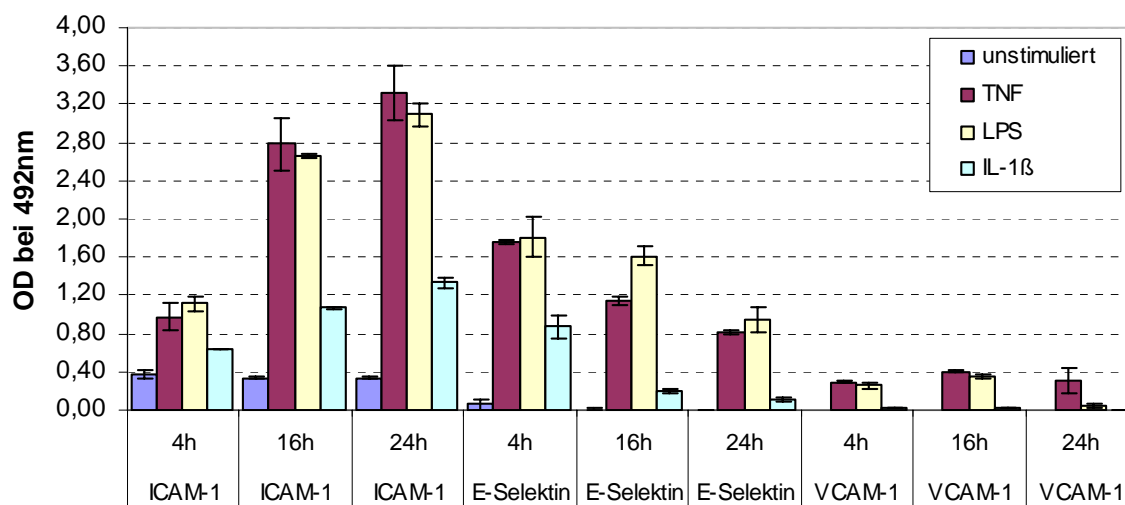


Abb. 51 Expression von ICAM-1, E-Selektin und VCAM-1 bei HPMEC nach Stimulation in Ko-Kulturmedium. ICAM-1, E-Selektin und VCAM-1-Expression bei HPMEC (P5) nach 4, 16 bzw 24-stündiger Inkubation in MCDB 131, 15% FKS, bFGF/Heparin ohne Stimulanz bzw. mit TNF- α (300 U/ml), LPS (1 μ g/ml) sowie IL-1 β (100 U/ml). Mittelwert \pm SD. n=4. Über einen Zeitraum von 6-24 h nahm für TNF- α , LPS und IL-1 β stimulierte HPMEC die Expression von ICAM-1 zu. Nach 4-stündiger Stimulation mit TNF- α , LPS sowie IL-1 β war eine hohe E-Selektin-Expression messbar, die dann nach 16 bis 24h langsam wieder abnahm. Die Expression von VCAM-1 war nach 16-stündiger Stimulation mit TNF- α maximal und nahm bis 24h wieder ab.

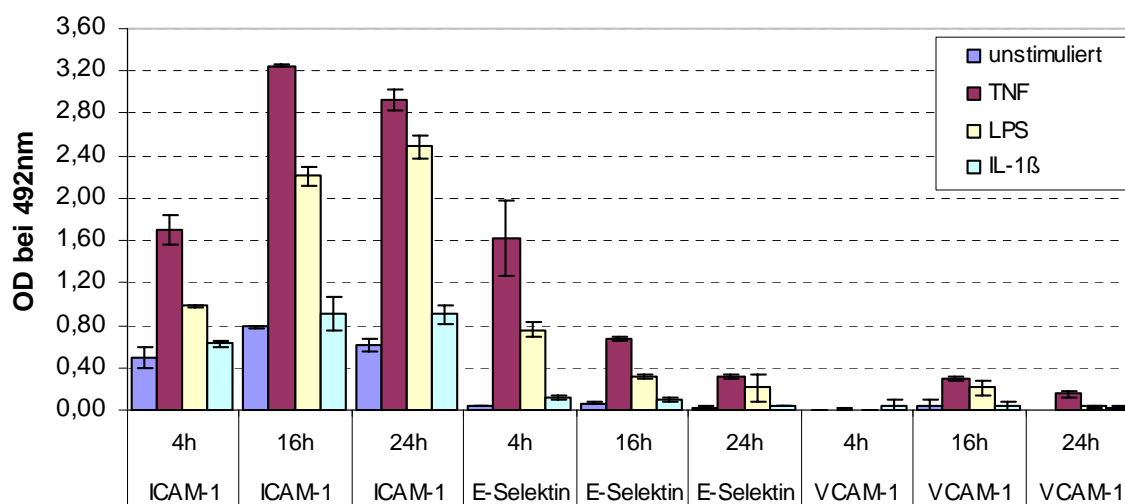


Abb. 52 Expression von ICAM-1, E-Selektin und VCAM-1 bei ISO-HAS-1 nach Stimulation in Ko-Kulturmedium. ICAM-1, E-Selektin und VCAM-1-Expression bei ISO-HAS-1 (P13) nach 4, 16 bzw 24-stündiger Inkubation in MCDB 131, 15% FKS, bFGF/Heparin ohne Stimulanz bzw. mit TNF- α (300 U/ml), LPS (1 μ g/ml) sowie IL-1 β (100 U/ml). Mittelwert \pm SD. n=4. Über einen Zeitraum von 6-24 h nahm für TNF- α , LPS und IL-1 β stimulierte ISO-HAS-1 die Expression von ICAM-1 zu. Nach 4-stündiger Stimulation mit TNF- α und LPS war eine hohe E-Selektin-Expression messbar, die dann nach 16 bis 24h langsam wieder abnahm. Die Expression von VCAM-1 war nach 16-stündiger Stimulation mit TNF- α maximal und nahm bis 24h wieder ab.

3.6.1.2 Vergleich der Freisetzung löslicher CAMs bei HPMEC und ISO-HAS-1

Adhäsionsmoleküle (CAMs) sind entweder in bestimmter Menge konstitutiv auf der Membran der Zellen lokalisiert und können durch Stimulation hochreguliert werden, wie ICAM-1, oder sie erscheinen erst nach Stimulation, z. B. mit proinflammatorischen Zytokinen, auf der Membranoberfläche der Zellen. Die extrazelluläre Domäne der CAMs kann proteolytisch abgespalten und als lösliche Form ins Medium sezerniert werden. Die Freisetzung der löslichen Formen von ICAM-1 und VCAM-1, sICAM-1 und sVCAM-1, wurde vergleichend nach Stimulation an HPMEC und ISO-HAS-1 bestimmt. Die Konzentrationen werden in pg/cm^2 konfluentem Zellrasen dargestellt. Innerhalb von 24h wurde eine Gesamtmenge von 1998 ± 72 pg sICAM-1 pro cm^2 nach Stimulation mit TNF- α produziert (Abb. 53). Entsprechend produzierten ISO-HAS-1 657 ± 39 pg sICAM-1 pro cm^2 nach 24-stündiger Stimulation mit TNF- α . HPMEC und ISO-HAS-1 zeigten ein ähnliches Expressionsmuster nach Stimulation für sICAM-1. Für ISO-HAS-1 lag die nach Stimulation freigesetzte Menge an sICAM-1 um ca. 1/3 niedriger als für HPMEC (Abb. 53 links). ISO-HAS-1 zeigten aber auch eine niedrigere basale Freisetzung von sICAM-1 als HPMEC.

HPMEC produzierten eine signifikante Menge an sVCAM-1 nach 24-stündiger Stimulation mit TNF- α (1518 ± 209 pg/cm^2) und LPS (1048 ± 120 pg/cm^2). Eine Freisetzung von sVCAM-1 ließ sich bei ISO-HAS-1 nicht nachweisen (Abb. 53 rechts).

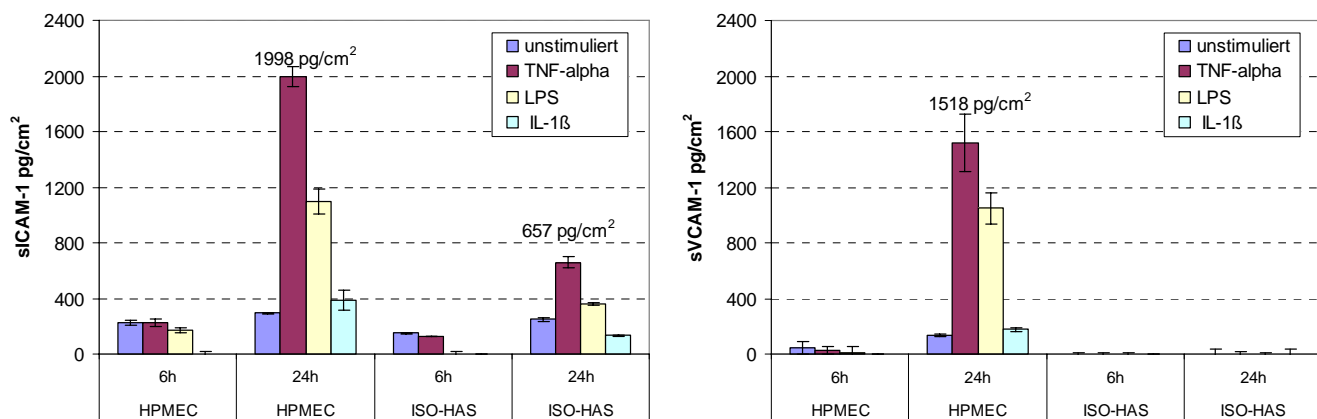


Abb. 53 Freisetzung von sICAM-1 bzw. sVCAM-1 bei HPMEC und ISO-HAS-1 in Ko-Kulturmedium. sICAM-1 und sVCAM-1-Expression bei HPMEC (P2) und ISO-HAS-1 (P31) nach 6 bzw 24-stündiger Inkubation in MCDB 131, bFGF/Heparin ohne Stimulanz bzw. mit TNF- α (300 U/ml), LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) sowie IL-1 β (100 U/ml). Mittelwert \pm SD. $n=6$. Nach 24-stündiger Stimulation der HPMEC und ISO-HAS-1 mit TNF- α und LPS wird vermehrt sICAM-1 ins Kulturmedium freigesetzt. Bei ISO-HAS-1 war die nach Stimulation freigesetzte Menge an sICAM-1 um ca. 1/3 niedriger als bei HPMEC. Eine signifikante Freisetzung von sVCAM-1 war bei HPMEC nach 24-stündiger Stimulation mit TNF- α und LPS messbar, während die Zell-Linie ISO-HAS-1 kein sVCAM sezernierte.

3.6.2 Freisetzung sekundärer inflammatorischer Mediatoren

Die Quantifizierung der basalen sowie stimulationsinduzierten Freisetzung der sekundären proinflammatorischen Zytokine IL-6, IL-8, RANTES und MCP-1 in den Mediumüberstand diente der weiteren Charakterisierung der ISO-HAS-1 im Vergleich zu primär isolierten HPMEC. Die Freisetzung sekundärer Immunmediatoren wurde nach Stimulation mit LPS (1 µg/ml), TNF-α (300 U/ml) und IL-1β (100 U/ml) analysiert.

Wie Abbildung 54 zeigt, wurde IL-6 von ISO-HAS-1 in geringer Menge um $31 \pm 0,5$ pg/cm² basal freigesetzt. HPMEC zeigten basal eine Freisetzung von $69,7 \pm 10$ pg/cm² IL-6 nach 6h, die in Messzeitraum von 24h auf 213 ± 6 pg/cm² anstieg. Bei beiden Zelltypen wurde die Freisetzung von IL-6 nach 24-stündiger Stimulation am stärksten durch LPS (1 µg/ml) gefolgt von TNF-α (300 U/ml) induziert. Nach 24h war die basale Expression von IL-6 durch Stimulation mit LPS (1 µg/ml) im Vergleich zur Kontrolle bei HPMEC achtfach und bei ISO-HAS-1 zehnfach erhöht. Die Stimulation der IL-6 Freisetzung durch IL-1β (100 U/ml) war bei HPMEC spenderabhängig. Der in Abbildung 54 (Abb. 54 rechts) dargestellte Spender reagierte mit einer gegenüber der Kontrolle nach 24h 4,6fach erhöhten Freisetzung von IL-6. ISO-HAS-1 ließen sich mit IL-1β (100 U/ml) nur leicht stimulieren. Die basale Freisetzung von IL-6 war bei HPMEC und ISO-HAS-1 unterschiedlich. Auch die absolut produzierten Mengen an IL-6 nach Stimulation waren für beide Zelltypen nicht gleich. Grundsätzlich zeigten ISO-HAS-1 und HPMEC jedoch, bis auf die Stimulation mit IL-1β, für die untersuchten Stimulanzen ein ähnliches Expressionsmuster von IL-6.

Wie für IL-6 war auch die absolut produzierte Menge an IL-8 für ISO-HAS-1 und HPMEC nicht gleich, was wiederum auf der unterschiedlichen basalen Freisetzung von IL-8 beruhen könnte. Abgesehen von der absolut freigesetzten Menge an IL-8 zeigen ISO-HAS-1 und HPMEC, bis auf die Stimulation mit IL-1β, ein vergleichbares Expressionsmuster von IL-8 (Abb. 55).

Auch bei der durch TNF-α (300 U/ml) und LPS (1 µg/ml) induzierten Freisetzung von MCP-1 war die Reaktion von ISO-HAS-1 mit der von HPMEC vergleichbar (Abb. 56). Auf eine Konzentration von 100 U/ml IL-1β reagierte die Zell-Linie ISO-HAS-1 schwächer als HPMEC. Ob eine höhere Konzentration an IL-1β eine verstärkte Freisetzung von MCP-1 induziert, muss noch untersucht werden.

Nach 24-stündiger Stimulation mit TNF-α (300 U/ml) und LPS (1 µg/ml) konnte bei ISO-HAS-1 und HPMEC die Freisetzung von RANTES nachgewiesen werden. HPMEC, die nach 24 h eine Menge von 212 ± 5 pg/cm² produzierten, scheinen wesentlich empfindlicher auf LPS zu reagieren als ISO-HAS-1 mit $30,2 \pm 2$ pg/cm² RANTES. Basal wurde von beiden endothelialen Zelltypen kein RANTES produziert (Abb. 57).

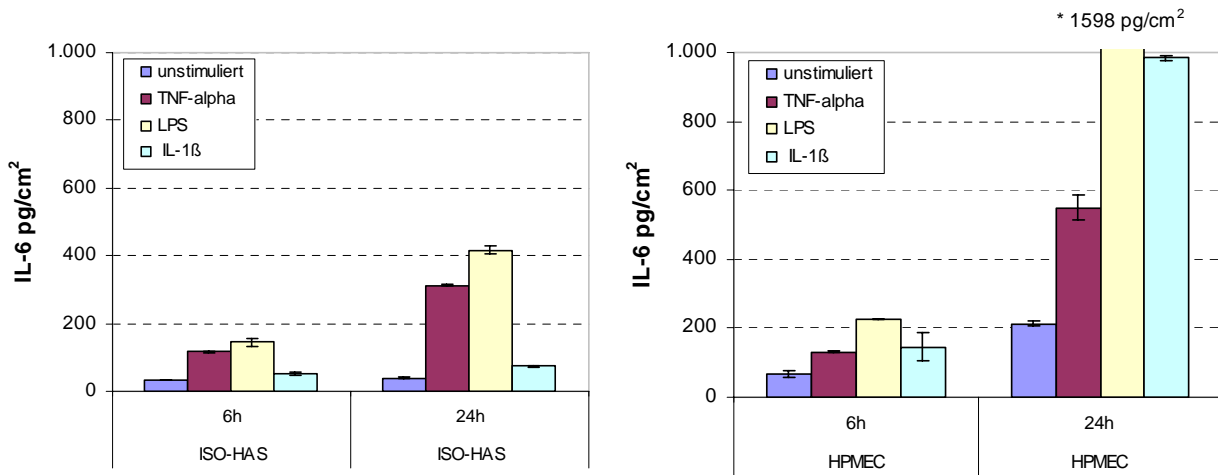


Abb. 54 Freisetzung von IL-6 nach Stimulation bei ISO-HAS-1 und HPMEC. Konzentration von IL-6 im Mediumüberstand von ISO-HAS-1 (P31) bzw. von HPMEC (P2) nach 6 bzw 24-stündiger Inkubation in MCDB 131, 5% FKS, bFGF/Heparin (links) ohne Stimulanz bzw. mit TNF- α (300 U/ml), LPS (1 μ g/ml) sowie IL-1 β (100 U/ml). Mittelwert \pm SD, n=4. (*errechnete Konzentration außerhalb der Standardkurve des ELISA's). ISO-HAS-1 setzten nach 6- und 24-stündiger Stimulation mit TNF- α und LPS vermehrt IL-6 frei. HPMEC zeigten nach 6- und 24-stündiger Stimulation mit TNF- α , LPS und IL-1 β eine signifikante Zunahme der IL-6 Konzentration pro cm² konfluenten Zellrasen. Bei ISO-HAS-1 und HPMEC löste LPS die stärkste Freisetzung von IL-6 aus.

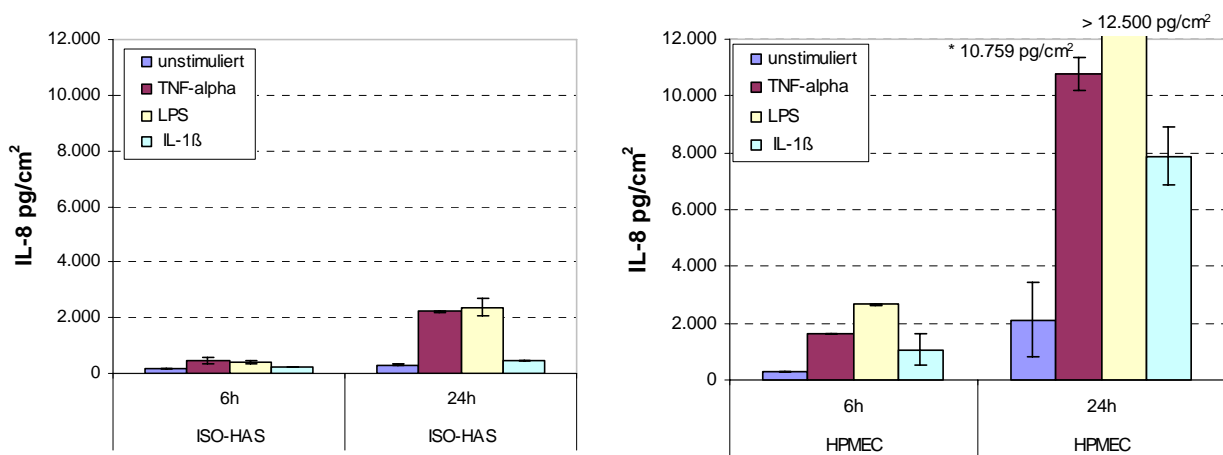


Abb. 55 Freisetzung von IL-8 nach Stimulation bei ISO-HAS-1 und HPMEC. Konzentration von IL-8 im Mediumüberstand von ISO-HAS-1 (P31) bzw. von HPMEC (P2) nach 6 bzw 24-stündiger Inkubation in MCDB 131, 5% FKS, bFGF/Heparin (links) ohne Stimulanz bzw. mit TNF- α (300 U/ml), LPS (1 μ g/ml) sowie IL-1 β (100 U/ml). Mittelwert \pm SD, n=4. (*errechnete Konzentration außerhalb der Standardkurve des ELISA's). ISO-HAS-1 setzten nach 6- und 24-stündiger Stimulation mit TNF- α und LPS vermehrt IL-8 frei. HPMEC zeigten nach 6- und 24-stündiger Stimulation mit TNF- α , LPS und IL-1 β eine signifikante Zunahme der IL-8 Konzentration pro cm² konfluenten Zellrasen. Bei ISO-HAS-1 und HPMEC löste LPS die stärkste Freisetzung von IL-8 aus.

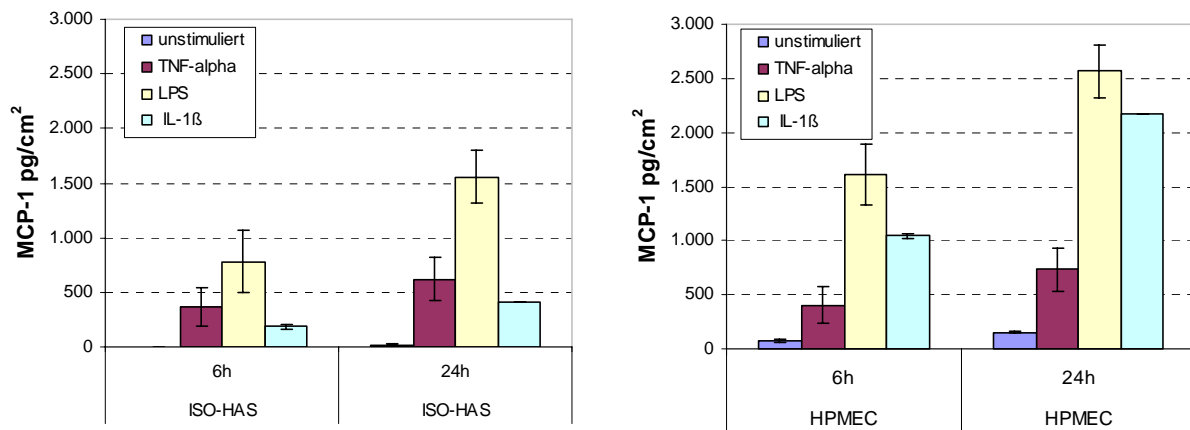


Abb. 56 Freisetzung von MCP-1 nach Stimulation bei ISO-HAS-1 und HPMEC. Konzentration von MCP-1 im Mediumüberstand von ISO-HAS-1 (P31) bzw. von HPMEC (P2) nach 6 bzw. 24-stündiger Inkubation in MCDB 131, 5% FKS, bFGF/Heparin (links) ohne Stimulanz bzw. mit TNF- α (300 U/ml), LPS (1 μ g/ml) sowie IL-1 β (100 U/ml). Mittelwert \pm SD, n=4. ISO-HAS-1 und HPMEC setzten nach 6- und 24-stündiger Stimulation mit TNF- α , LPS und IL-1 β vermehrt MCP-1 frei. Bei ISO-HAS-1 und HPMEC löste LPS die stärkste Freisetzung von IL-6 aus. HPMEC setzten nach Stimulation mit 100 U/ml IL-1 β wesentlich höhere Mengen an MCP-1 in Kulturmedium frei als ISO-HAS-1.

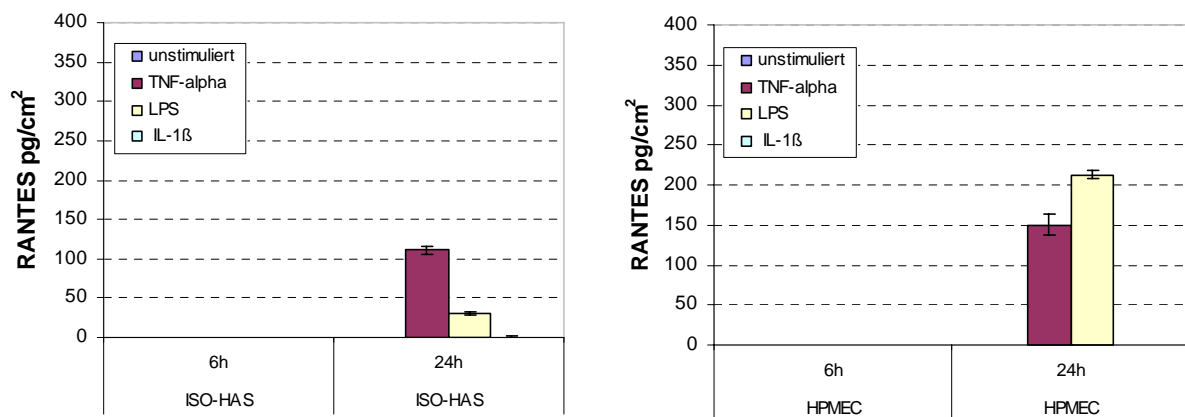


Abb. 57 Freisetzung von RANTES nach Stimulation bei ISO-HAS-1 und HPMEC. Konzentration von MCP-1 im Mediumüberstand von ISO-HAS-1 (P31) bzw. von HPMEC (P2) nach 6 bzw. 24-stündiger Inkubation in MCDB 131, 5% FKS, bFGF/Heparin (links) ohne Stimulanz bzw. mit TNF- α (300 U/ml), LPS (1 μ g/ml) sowie IL-1 β (100 U/ml). Mittelwert \pm SD, n=4. ISO-HAS-1 und HPMEC setzten nach 24-stündiger Stimulation mit TNF- α und LPS RANTES frei. Bei ISO-HAS-1 und HPMEC lösten 300 U/ml TNF- α die stärkste Freisetzung von RANTES aus, während bei HPMEC 1 μ g/ml LPS die stärkste Freisetzung von RANTES induzierte.

3.7 Etablierung des Ko-Kulturmodells

Um den dreidimensionalen Aufbau der alveolo-kapillären Einheit zu imitieren, wurde eine Anordnung gewählt, bei dem Alveolarepithel- und Endothelzellen in engem Kontakt auf beiden Seiten einer dünnen mikroporösen Filtermembran ko-kultiviert wurden (siehe Kap. 2.14).

3.7.1 Art der Membraneinsätze und Notwendigkeit einer Matrixbeschichtung

Da Zellen sensibel auf die Art der eingesetzten Kulturoberfläche reagieren, wurden die Adhäsions- und Wachstums-Eigenschaften einer Mono-Kultur der Zell-Linien ISO-HAS-1, A549, NCI H441 und NCI H820 auf verschiedenen Materialien für Membraneinsätze getestet. Im Hinblick auf den späteren Aufbau des Ko-Kulturmodells (Kap. 2.14) wurden die endothelialen Zell-Linien immer auf die Unterseite und die epithelialen Zell-Linien immer auf die Oberseite der Filtermembranen ausgesät.

Zur Ko-Kultivierung der untersuchten Zell-Linien haben sich kommerziell hergestellte Membraneinsätze aus lichtundurchlässigem Polycarbonat (PC, Porengröße von 0,4 µm) als geeignete Kulturoberflächen erwiesen. Der Einsatz transparenter Membranfilter aus Polyester hatte für die mikroskopische Beurteilung der Ko-Kultur keine Vorteile, da die einzelnen Zell-Layer in der Ko-Kultur optisch schwer unterscheidbar waren. Polycarbonat-Membranen besitzen zudem eine hohe Anzahl an Poren, und ermöglichen somit einen raschen Stoffaustausch zwischen beiden Zellkompartimenten. Wegen ihrer geringen Dicke (10 µm), die wegen der kurzen Diffusionsstrecke eine schnelle zelluläre Interaktion erlaubt, wurden die Transwell Polycarbonat-Membraneinsätze der Firma Costar für die Versuche ausgewählt. Verwandt wurden Membraneinsätze ohne Beschichtung bzw. mit Fibronectin bzw. Kollagen Typ 1-Beschichtung.

Eine Beurteilung der Adhäsions- und Wachstumseigenschaften auf den undurchsichtigen PC-Membranen konnte nicht während der Kultivierung durchgeführt werden. Deshalb wurden die Kulturen auf den Membranfiltern zu unterschiedlichen Zeiten fixiert und die Zellen mittels Immunfluoreszenz beurteilt. Bei den epithelialen Zell-Linien A549 und NCI H441 waren für das Adhäsions- und Ausbreitungsverhalten keine Unterschiede zwischen unbeschichteten und beschichteten Polycarbonat-Membraneinsätze feststellbar. NCI H820 und beide untersuchten endothelialen Zell-Linien zeigten dagegen eine erhöhte Adhäsion an beschichtete Filtermembranen. Für die Endothelzellen erleichterte eine Beschichtung mit Fibronectin bzw. Kollagen Typ 1 die Adhäsion der Zellen an die Filterunterseite (umgedrehter Filter) und verkürzte die Adhäsionszeit auf 2 Stunden bei 37°C. Die Adhärenz und Ausbreitung der ISO-HAS-1 und HPMEC war bei einer Beschichtung mit Fibronectin und Kollagen Typ 1 vergleichbar gut (nicht gezeigt). NCI H820 adhärten besser an Kollagen Typ 1 beschichtete Filter. Daher wurde die weiteren Versuche eine Beschichtung mit Kollagen Typ 1 für beide Seiten des Membranfilters durchgeführt.

3.7.2 Ermittlung der optimalen Aussaatdichte

Da für die Etablierung eines physiologisch relevanten Ko-Kultursystems die Differenzierung der Epithelzellen eine wichtige Rolle spielte, wurde zunächst das Wachstums- und Differenzierungsverhalten der Epithelzell-Linien NCI H441, NCI H820 und A549 in Mono-Kultur auf Filtermembranen im Hinblick auf die Ausbildung eines intakten Monolayers untersucht. Die Ausbildung von *Tight Junctions* im Verlaufe der Kultivierung wurde über eine Messung des TER bestimmt. Als Kontrolle diente eine Epithelzell-Linie aus der Hundeniere, MDCK (Madin Darby Canine Kidney) Zellen, die Monolayer mit hohen TER-Werten um $2000-10000 \Omega \times \text{cm}^2$ ausbildet (Ward et al., 2000). Um eine Differenzierung der Epithelzellen zu erreichen, erhielten die Zellen über einen längeren Zeitraum die Möglichkeit, auf der Filteroberfläche zu proliferieren und *Tight Junctions* auszubilden. Daher wurde das Wachstums- und Differenzierungsverhalten von subkonfluent ausgesäten NCI H441, NCI H820 und A549 im Laufe einer 14-tägigen Kulturdauer untersucht.

Hier wurden die Zellzahlen eingesetzt, die zuvor bei den Proliferationsstudien in Mono-Kultur ermittelt wurden (siehe Kap. 3.3 und Anhang). A549 und NCI H441 wurden in einer Zelldichte von 2×10^4 Zellen/cm² und NCI H820 mit $3-5 \times 10^4$ Zellen/cm² auf die Oberseite der Filtermembran ausgesät. In Mono-Kultur für A549 bzw. NCI H441 maximal ermittelte TER-Werte lagen im Bereich von $13 \pm 2 \Omega \times \text{cm}^2$ bzw. $44 \pm 3 \Omega \times \text{cm}^2$ an Tag 10-12 der Kultivierung. NCI H820 zeigten in Mono-Kultur wesentlich höhere maximale TER-Werte von $1038 \pm 149 \Omega \times \text{cm}^2$ auf HTS 24 Transwell-Filter-Platten. A549 und NCI H441 bildeten, wie bei Proliferationsstudien schon gezeigt wurde, in Ko-Kulturmedium keinen kontaktinhibierten Monolayer aus und schienen daher auch keine funktionellen Zell-Zell-Verbindungen mit *Tight Junctions* aufzubauen.

Endothelzellen besitzen zwar ebenfalls *Tight Junctions*, diese sind jedoch nicht so hoch organisiert wie die *Tight Junctions* der Epithelzellen, daher werden bei vaskulären Endothelzellen meist nur geringe TER-Werte gemessen. Bei Mono-Kulturen von ISO-HAS-1 bzw. HPMEC in einer Zelldichte von 5×10^4 Zellen/cm² wurden maximale TER-Werte von $11 \pm 2 \Omega \times \text{cm}^2$ bzw. $16 \pm 3 \Omega \times \text{cm}^2$ auf HTS 24 Transwell-Filter-Platten gemessen. Die Integrität des endothelialen Monolayers konnte daher nicht während der Kultur über die Bestimmung der TER-Werte beurteilt werden, sie wurde beim Immunfluoreszenznachweis von Zell-Zell-Kontaktmolekülen zu unterschiedlichen Zeiten der Kultivierung auf HTS 24 Transwell-Filter-Platten nachgewiesen (siehe Kap. 3.8.3 und 3.9.2).

3.7.3 Aufbau des Ko-Kulturmodells

Der Modellaufbau als Bilayer mit Alveolarepithel- und Endothelzellen auf gegenüber liegenden Seiten einer dünnen mikroporösen Filtermembran trennt die beiden Zelltypen physikalisch, ermöglicht aber auch eine parakrine Kommunikation der Zellen.

Abbildung 58 zeigt einen Semidünnschnitt der Ko-Kultur von NCI H441 mit ISO-HAS-1 (Transmissionselektronenmikroskopische (TEM) Aufnahme). Auf der oberen Fläche der mikroporösen Filtermembran wachsen NCI H441 mit einem für Alveolarepithelzellen vom Typ II

typischen kuboidalen morphologischen Phänotyp. Auf der Unterseite der Filtermembran sind ISO-HAS-1 erkennbar. Sie sind, wie für Endothelzellen typisch, flach ausgebreitet und mit einer hervortretenden Kernregion und einer flach auslaufenden Zytoplasmaregion. Die Aufsicht auf die gebildeten konfluenten Zell-Layer ist in der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahme für HPMEC (Abb. 59A) und NCI H441 (59B) dargestellt.

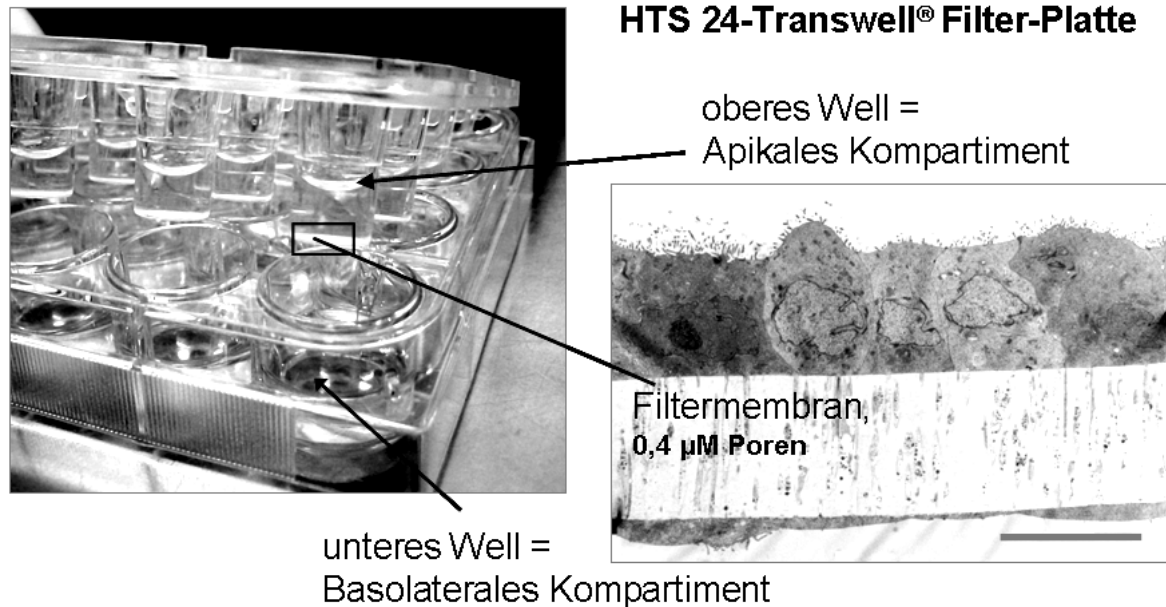


Abb. 58 *Aufbau des Ko-Kulturmodells als Bilayer auf einem Transwell einer 24 Transwell-Filter-Platte. HTS 24 Transwell-Filter-Platte (links) und Vergrößerung der Filtermembran im Querschnitt (rechts). Die Vergrößerung stellt eine elektronenmikroskopische Aufnahme der Bilayer-Ko-Kultur von NCI H441 auf der oberen Seite und ISO-HAS-1 auf der unteren Seite der Filtermembran einer Transwells der HTS 24 Transwell-Filter-Platte dar. Größenmarkierung = 10 µm. Als geeignetes System für Mehrfachbestimmungen besteht ein Experiment aus 24 solcher Bilayer-Ko-Kulturen, die jeweils in einem Well einer 24 Well-Multiwellplatte (Cluster-Platte) kultiviert werden.*

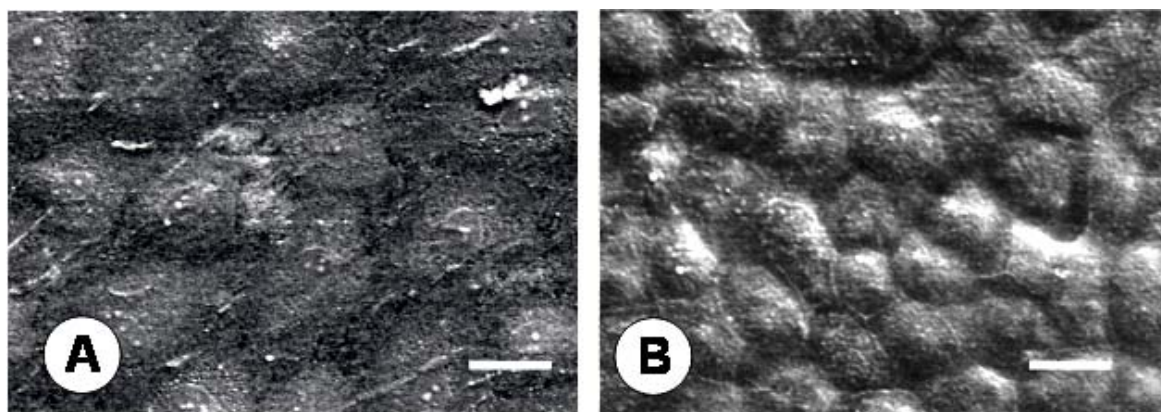


Abb. 59 *Rasterelektronenmikroskopie von HPMEC bzw. NCI H441 auf der Unter- bzw. Oberseite der Filtermembran. Aufsicht auf die Unterseite eines Polycarbonat-Membranfilters mit HPMEC (A) und Aufsicht auf die Oberseite des Membranfilters mit NCI H441 (B), Rasterelektronenmikroskopie, Größenmarkierung = 10 µm.*

Ein wichtiges Kriterium für die Ko-Kultur der epithelialen und endothelialen Zell-Linien war deren Differenzierung im Hinblick auf die Ausbildung einer funktionellen Barriere. Die Differenzierung sollte, ähnlich der Vorgehensweise beim *tissue engineering*, in 3 Schritten induziert werden: Zunächst ließ man die Zellen auf der Kulturoberfläche proliferieren und einen fast konfluenten Monolayer ausbilden. Dazu wurde nach den Daten des Proliferationsverhaltens in Mono-Kultur (Kap. 3.3) ein Zeitraum von 3 Tagen in Ko-Kultur angesetzt. Anschließend wurde die Differenzierung der Zellen eingeleitet. Hier sollte der Einfluss von serumfreiem Medium bzw. der Einfluss des Glukokortikoids Dexamethason auf die Ausbildung eines dichten zellulären Layers von Epithel- und Endothelzellen untersucht werden. Die Ausbildung von *Tight Junctions* im Verlaufe der Kultivierung wurde zunächst über die Bestimmung der TER-Werte der Ko-Kulturen ermittelt. Über einen Zeitraum von 14 Tagen in Ko-Kultur wurde dann die Aufrechterhaltung der Differenzierung der Zellen beobachtet. Diese wurde morphologisch und über die Ausbildung einer dichten Barriere mit *Tight Junction* und *Adherens Junction*-Strukturen überprüft.

3.8 Ko-Kultur: Epithelzell-Linien (A549/H441) mit ISO-HAS-1

Die in Mono-Kultur für A549 bzw. NCI H441 ermittelten TER-Werte von $13 \pm 2 \Omega \times \text{cm}^2$ bzw. $44 \pm 3 \Omega \times \text{cm}^2$ wiesen auf eine unzureichende Differenzierung der Zell-Linien in Hinblick auf die Ausbildung von *Tight Junctions* hin. In weiteren Versuchen wurde daher überprüft, ob die Ko-Kultivierung mit Endothelzellen über parakrine Faktoren die Differenzierung der Epithelzellen beeinflusst. Außerdem wurde der Effekt des Glukokortikoids Dexamethason, von dem eine Wirkung auf die Differenzierung und Reifung von Zellen des Lungenepithels (Oshika et al., 1998) und eine *Tight Junction*-stabilisierende Wirkung bei Mamma-Epithelzellen beschrieben ist (Zettl et al., 1992), auf die Induktion funktioneller *Tight Junctions* bei den Zell-Linien A549 und NCI H441 untersucht.

3.8.1 Transzellulärer elektrischer Widerstand (TER) in serumhaltigem Medium nach Stimulation mit Dexamethason

Der Einfluss von Dexamethason auf die Ausbildung von *Tight Junctions* wurde zunächst an Mono-Kulturen von A549 und NCI H441 auf Filtermembranen und in Ko-Kultur mit der endothelialen Zell-Linie ISO-HAS-1 untersucht. Zu den Zellen der oberen Kammer des Transwells (NCI H441 bzw. A549) wurde am Tag 3 der Kultivierung (subkonfluente Zell-Layer) Medium mit $1 \mu\text{M}$ Dexamethason zugegeben. Diese Konzentration von Dexamethason zeigte den größten Effekt auf die Proliferation der epithelialen Zell-Linien (siehe Kap. 3.4.3.1).

NCI H441 wiesen im Verlaufe der Mono-Kultur in Ko-Kulturmedium (MCDB 131, 5% FKS und bFGF/Heparin (2,5 ng/ 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)) ein unregelmäßiges, löchriges Wachstumsmuster auf. Da Lücken im Zell-Layer die Messung des TER-Wertes beeinflussen, wurde zusätzlich ein für die Kultivierung von NCI H441 beschriebenes Kulturmedium, RPMI mit 10% FKS, eingesetzt, in dem die NCI H441 gleichmäßiger wuchsen. Zum Vergleich der beiden Medien wurden die Zellen der unteren Kammer des Transwells (ISO-HAS-1) immer mit Ko-Kulturmedium und die Zellen der obere Kammer

(NCI H441) entweder mit Ko-Kulturmedium oder mit RPMI, 10% FKS kultiviert. Die Entwicklung der TER-Werte in Mono-Kulturen von NCI H441 und Ko-Kulturen von NCI H441/ISO-HAS-1 wurde ohne und mit 1 μM Dexamethason vergleichend untersucht.

Für Mono-Kulturen von NCI H441 auf HTS 24-Transwell-Filter-Platten konnten in RPMI 10% FKS mit 1 μM Dexamethason maximale TER-Werte von $241 \pm 2 \Omega \times \text{cm}^2$ am Tag 13 erreicht werden (Abb. 60 A), während in Ko-Kulturmedium mit 1 μM Dexamethason ein TER-Wert von $33 \pm 5 \Omega \times \text{cm}^2$ nicht überschritten wurde (Abb. 60 B). Unabhängig vom Medium lagen die TER-Werte der Ko-Kulturen ohne Dexamethason von Tag 11 bis 13 um $110 \pm 40 \Omega \times \text{cm}^2$ und mit Dexamethason maximal um $400 \Omega \times \text{cm}^2$. Verglichen mit der Kultivierung in RPMI mit 10% FKS traten in Ko-Kulturmedium hohe Schwankungen zwischen den einzelnen Wells der Ko-Kulturen ($n = 4$) auf ($251 \pm 143 \Omega \times \text{cm}^2$), die auf ein unregelmäßiges Wachstum der NCI H441 in Ko-Kulturmedium hindeuteten (Abb. 60 B). Das gleichmäßigere Wachstum der NCI H441 Zellen in RPMI mit 10% FKS und die Ausprägung stabiler TER-Werte von $313 \pm 62 \Omega \times \text{cm}^2$ und $349 \pm 50 \Omega \times \text{cm}^2$ an Tag 11 respektive Tag 12 der Ko-Kultur bei Zugabe von Dexamethason (Abb. 60 A) bedingten eine Umstellung der Kulturbedingungen für die Ko-Kultur von NCI H441 mit ISO-HAS-1 bzw. HPMEC auf RPMI 10% FKS im oberen Well und Ko-Kulturmedium (MCDB 131 5% FKS, bFGF/Heparin) im unteren Well, in Folge RP/MC genannt.

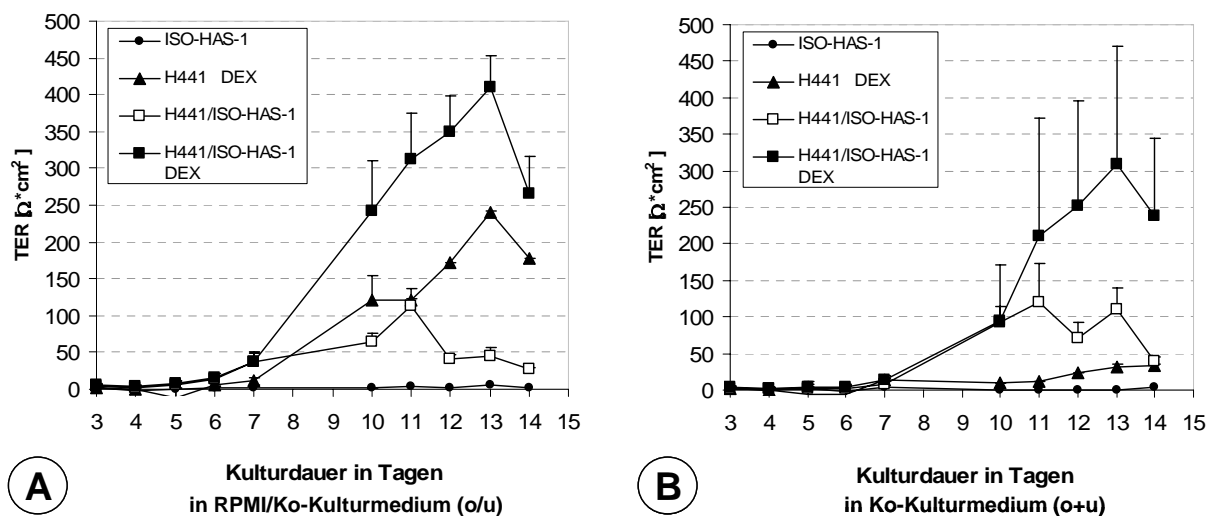


Abb. 60 Transzellulärer elektrischer Widerstand (TER) von NCI H441 in Mono- und Ko-Kultur mit ISO-HAS-1 in verschiedenen Medien ohne und mit Dexamethason. TER-Werte im Verlaufe der Kultur in RPMI 10% FKS (oben) und MCDB 131 5% FKS, bFGF/Heparin (unten) (A) bzw. in MCDB 131 5% FKS, bFGF/Heparin (oben + unten) (B) für ISO-HAS-1 ohne (●), NCI H441 mit 1 μM Dexamethason (▲) und bei Ko-Kulturen von NCI H441 mit ISO-HAS-1 ohne (□) und mit 1 μM Dexamethason (■). ($n=4$). Mit RPMI 10% FKS und 1 μM Dexamethason im oberen Well und Ko-Kulturmedium im unteren Well wurden für NCI H441 in Monokultur und für die Bilayer-Ko-Kultur von NCI H441 mit ISO-HAS-1 gleichmäßigere TER-Werte erhalten als in Ko-Kulturmedium alleine.

3.8.2 Transzellulärer elektrischer Widerstand (TER) in serumfreiem Medium mit und ohne Dexamethason

Eine Umstellung der Mono-Kulturen von A549 bzw. ISO-HAS-1 nach dreitägiger Kultivierung in Ko-Kulturmedium auf serumfreies MCDB 131 mit ITS⁺ (=Ko-Kulturmedium ohne Serum und Wachstumsfaktoren aber mit ITS⁺ als Serumersatz) führte zu einer differenzierter pflastersteinartigen Zell-Layer von ISO-HAS-1 mit gut ausgeprägten Zell-Zell-Verbindungen (siehe Anhang). A549 zeigten dagegen in Mono-Kultur in serumfreiem MCDB 131 mit ITS⁺ wenig differenzierte Zell-Zell-Kontakte. An Ko-Kulturen der Epithelzell-Linien A549 bzw. NCI H441 mit ISO-HAS-1 wurde untersucht, ob die Ko-Kultivierung in serumfreiem Medium einen Einfluss auf den Aufbau einer dichten epithelialen Barriere hatte. Außerdem sollte überprüft werden, ob durch die Gabe von Dexamethason in serumfreiem Medium der TER-Wert der Ko-Kulturen gesteigert werden konnte.

In serumfreiem Medium (MCDB 131 mit ITS⁺) wurden für Ko-Kulturen von A549 mit ISO-HAS-1 auf HTS 24-Transwell-Filter-Platten maximale TER-Werte von $13 \pm 2 \Omega \times \text{cm}^2$ erreicht. Für NCI H441 in Ko-Kultur mit ISO-HAS-1 waren maximale TER-Werte von $63 \pm 9 \Omega \times \text{cm}^2$ messbar.

Die Zugabe von $1 \mu\text{M}$ Dexamethason zum serumfreien Medium konnte bei Ko-Kulturen von A549 mit ISO-HAS-1 die TER-Werte gegenüber der Kontrolle ohne Dexamethason nicht erhöhen. Demgegenüber war in serumhaltigem Ko-Kulturmedium durch $1 \mu\text{M}$ Dexamethason eine Steigerung der TER-Werte von $13 \pm 2 \Omega \times \text{cm}^2$ auf $31 \pm 7 \Omega \times \text{cm}^2$ für A549/ISO-HAS-1 zu erreichen (nicht gezeigt).

Für NCI H441 in Mono- bzw. in Ko-Kultur mit ISO-HAS-1 konnte die Zugabe von $1 \mu\text{M}$ Dexamethason in serumfreiem Medium ebenfalls keine Steigerung der TER-Werte gegenüber den Kulturen ohne Dexamethason hervorrufen (Abb. 61B). In Anwesenheit von Serum (5% FKS) wurde der TER-Wert sowohl für die Mono-Kultur von NCI H441 als auch für die Ko-Kultur NCI H441/ISO-HAS-1 durch Dexamethason jedoch signifikant erhöht (Abb. 61A). In beiden Fällen (Mono- sowie Ko-Kultur) konnte der TER-Wert durch Supplementierung mit $1 \mu\text{M}$ Dexamethason ca. 6fach gesteigert werden. Daraus ergab sich ein maximaler TER-Wert von $420 \pm 60 \Omega \times \text{cm}^2$ für die Ko-Kultur von NCI H441 mit ISO-HAS-1.

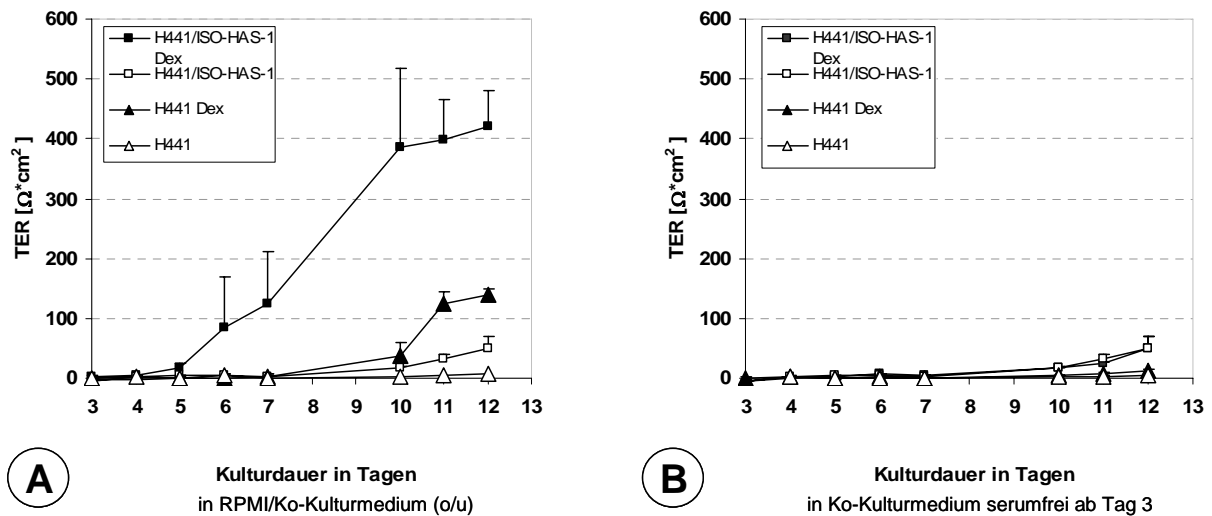


Abb. 61 Transzellulärer elektrischer Widerstand (TER) von NCI H441 in Mono- und Ko-Kultur mit ISO-HAS-1 in serumhaltigem und serumfreiem Medium ohne und mit Dexamethason. TER-Werte im Verlaufe der Kultur in RPMI 10% FKS (oben) und MCDB 131 5% FKS, bFGF/Heparin (unten) (RP/MC (o/u)) (A) bzw. in RP/MC (o/u) bis Tag 3 und weitere Kultur serumfrei (MCDB 131 mit ITS⁺) (B) für NCI H441 ohne (\triangle) und mit 1 μ M Dexamethason (\blacktriangle) und für Ko-Kulturen von NCI H441 mit ISO-HAS-1 ohne (\square) und mit 1 μ M Dexamethason (\blacksquare). ($n=3$ bzw. für NCI H441/ISO-HAS-1 mit 1 μ M Dexamethason $n=15$, 5 verschiedene Experimente). Durch Zugabe von 1 μ M Dexamethason wurden für die Bilayer-Ko-Kultur nach 10 bis 12 Tagen in serumhaltigem Medium TER-Werte von $420 \pm 60 \Omega \times \text{cm}^2$ ausgebildet, während die TER-Werte in serumfreiem Medium nicht anstiegen.

Da eine Steigerung der TER-Werte mit Dexamethason nur in serumhaltigem Medium erreicht wurde, wurden alle weiteren Experimente in Medium mit Serum durchgeführt.

3.8.3 Proliferation und Expression von Differenzierungsmarkern im Verlauf der Ko-Kultur

Als Marker für die Ausbildung von *Adherens Junctions* und *Tight Junctions* wurde entweder VE-Cadherin bei ISO-HAS-1 oder ZO-1 und E-Cadherin bei A549 bzw. NCI H441 Zellen mittels Immunfluoreszenz an Tag 7, Tag 11 und Tag 14 der Ko-Kultur nachgewiesen. Besonders bei der Ko-Kultur von NCI H441 mit ISO-HAS-1 ohne Dexamethason konnte eine im Verlaufe der Kultur verstärkte angiogene Aktivierung von ISO-HAS-1 nachgewiesen werden. Bei der Darstellung der Zell-Zell-Kontakte mittels Immunfluoreszenz konnte gezeigt werden, dass ISO-HAS-1 in Ko-Kultur mit NCI H441 ohne Dexamethason ein netzartiges Wachstumsmuster mit gefäßähnlichen Strukturen ausbildeten (Abb. 62D).

Sowohl mit als auch ohne Dexamethason-Zugabe war am Tag 7 der Ko-Kultur die Expression von VE-Cadherin bei ISO-HAS-1 an den Zell-Zell-Kontakten verstärkt, wobei unter beiden Bedingungen kein streng geordneter Monolayer von ISO-HAS-1 zu beobachten war. Am Tag 11 ohne Dexamethason-Zugabe zeigte sich ein beginnendes dreidimensionales netzartiges Wachstum der ISO-HAS-1 in Ko-Kultur mit einer regionalen Ausbildung von gefäßähnlichen Strukturen (Abb. 62D). Am Tag 11 wurde VE-Cadherin bei den gefäßähnlichen Strukturen verstärkt an den Zell-Zell-Kontaktstellen benachbarter Zellen exprimiert (Abb. 62D), während VE-Cadherin bei ISO-HAS-1 in konfluenter Kultur eher auf der Zelloberfläche verteilt mit einer an den Zellgrenzen leicht verstärkten Expression nachweisbar war (Abb. 62B, F, H).

Der morphologische Phänotyp der NCI H441 wurde durch Gabe von 1 μ M Dexamethason in Ko-Kultur auf Membraneinsätzen deutlich beeinflusst. Dargestellt durch einzeln liegende Zellkerne (Hoechst 33342, blau) in der Aufsicht, erschien der Zell-Layer von NCI H441 bis zum Tag 7 sowohl mit als auch ohne Dexamethason als Monolayer (Abb. 62A, E). An Tag 7 befanden sich die meisten Zellen in einer proliferativen Phase (positive Markierung mit Ki67). Unterschiede der Ko-Kulturen mit und ohne Dexamethason zeigten sich am Tag 7 bei der Markierung mit anti-ZO-1. Mit Dexamethason erschien ZO-1 als schmales Band an den Zellgrenzen der NCI H441 während es ohne Dexamethason fragmentiert an den Zellgrenzen lokalisiert war (Abb. 62A und 62E). Die Markierung des Proliferationsmarkers Ki67 zeigte am Tag 11 ebenfalls Unterschiede, während ohne Dexamethason fast alle NCI H441 positiv waren, befanden sich mit 1 μ M Dexamethason weniger als ein Drittel der NCI H441 in proliferativer Phase (Abb. 62C und 62G). An Tag 7 mit Dexamethason war Ki 67 bei NCI H441 als Netzwerk an der Oberfläche der kondensierten Chromosomen nachweisbar, was einer Darstellung der Mitosephase der Zellen entspricht. Währenddessen waren an Tag 11 mit Dexamethason nur noch vereinzelt proliferative NCI H441 in G1-Phase nachweisbar (Markierung von Ki 67 kondensiert in und um den neu gebildeten Nukleolus und die Heterochromatinbezirke des Kerns).

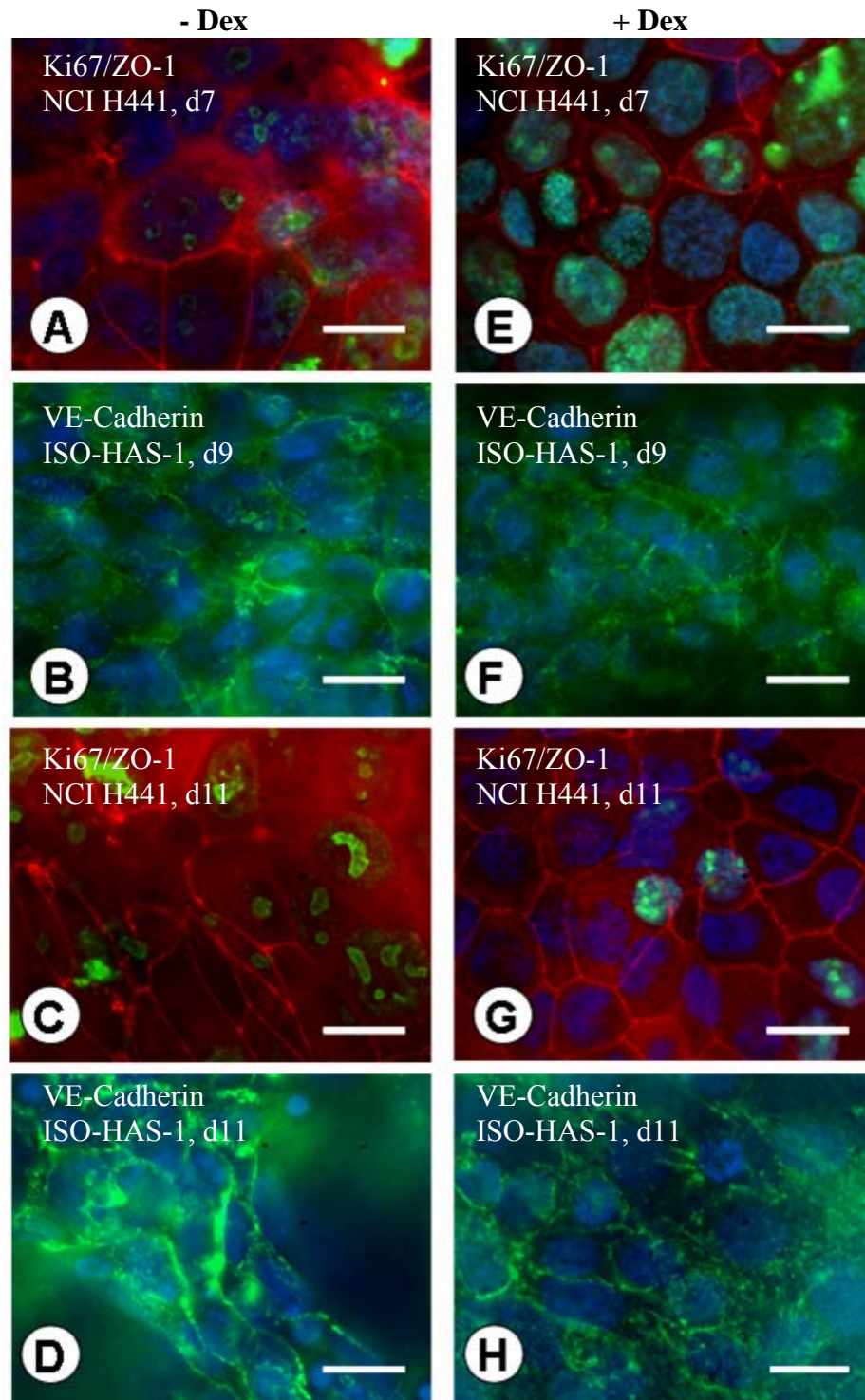


Abb. 62 Expression von Zell-Zell-Kontaktmolekülen und Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 bei Ko-Kulturen von NCI H441 mit ISO-HAS-1 ohne und mit Dexamethason. Immunfluoreszenz-Markierung einer Ko-Kultur von NCI H441 mit ISO-HAS-1 auf der oberen bzw. unteren Fläche einer Polycarbonat-Filtermembran, NCI H441 markiert mit anti-ZO-1 (rot) und anti-Ki 67 (grün) an Tag 7 und Tag 11 der Ko-Kultur ohne (A und C) und mit 1 μ M Dexamethason (E und G), ISO-HAS-1 auf der gegenüberliegenden Seite der Filtermembran markiert mit anti-VE-Cadherin an Tag 7 und Tag 11 der Ko-Kultur ohne (B und D) und mit 1 μ M Dexamethason (F und H). In allen Präparaten Kerngegenfärbung blau, Größenmarkierung = 10 μ m. Mit Dexamethason waren an Tag 11 Monolayer von NCI H441 und ISO-HAS-1 mit regelmäßigen Zell-Zell-Kontakte und nur vereinzelt Ki-67 positive NCI H441 nachweisbar. Ohne Dexamethason waren NCI H441 weiter proliferativ aktiv und ISO-HAS-1 bildeten netzartige, gefäßähnliche Strukturen aus.

Die distinkte Expression von ZO-1 an den Zellgrenzen der NCI H441 und ein geordneter Layer von NCI H441 konnte bis zum Tag 11, 8 Tage nach Zugabe von Dexamethason, nachgewiesen werden (Abb. 62G). Am Tag 14 der Ko-Kultur wurden ebenfalls nach Dexamethason-Behandlung Areale mit vereinzelter ZO-1 Markierung beobachtet, die auf ein beginnendes mehrschichtiges Wachstum der NCI H441 hinwiesen (nicht gezeigt).

Bei A549 war ZO-1 unabhängig von der Stimulation mit Dexamethason fragmentiert an den Zellgrenzen lokalisiert. ISO-HAS-1 verhielten sich in Ko-Kultur mit der Zell-Linie A549 ähnlich wie in Ko-Kultur mit NCI H441 (nicht gezeigt).

3.8.4 Elektronenmikroskopische Untersuchung der etablierten Ko-Kulturen

Bei Ko-Kulturen von NCI H441 mit ISO-HAS-1 bildete die Angiosarkomzell-Linie ISO-HAS-1 keinen streng kontaktinhibierten Monolayer aus. An Querschnitten der Ko-Kulturen konnte bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung die Ausbildung eines partiellen Multilayers beobachtet werden. Diese trat vermehrt bei ISO-HAS-1 in Ko-Kultur mit NCI H441 ohne Dexamethason auf (siehe Abb. 63A, Stern), während bei Zugabe von Dexamethason bis zum Tag 12 der Ko-Kultivierung ein meist regelmäßiger Monolayer von ISO-HAS-1 nachweisbar war (Abb. 63B).

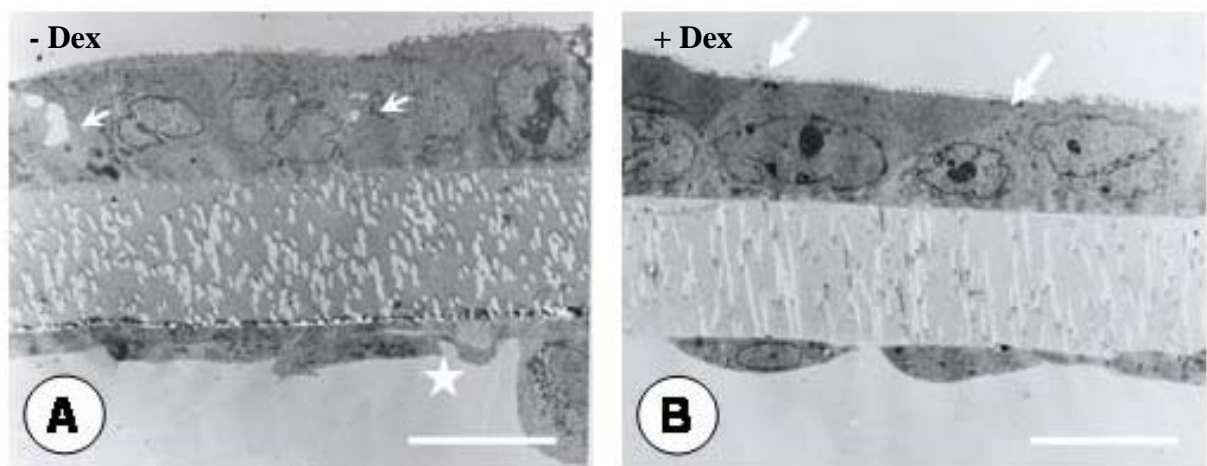


Abb. 63 EM-Bilder von Ko-Kulturen von NCI H441 (oben) mit ISO-HAS-1 (unten) ohne und mit 1 μ M Dexamethason. Ko-Kulturen von NCI H441 und ISO-HAS-1 ohne Dexamethason Tag 12 (A) sowie mit 1 μ M Dexamethason an Tag 12 (B). Unbehandelte NCI H441 mit weitem parazellulären Zwischenraum nach 12 Tagen im Vergleich zu engen Zell-Zell-Kontakten bei Dexamethason-behandelten NCI H441 (B, Pfeil und A, Pfeil). ISO-HAS-1 bilden lokale Multilayer (A, Stern) nach 12 Tagen in Ko-Kultur mit unbehandelten NCI H441 aus. Transmissionselektronenmikroskopie, NCI H441 oben, ISO-HAS-1 unten. (Größenmarker = 10 μ m). Mit Dexamethason bildeten NCI H441 und ISO-HAS-1 in Ko-Kultur jeweils einen Monolayer mit regelmäßigen Zell-Zell-Kontakten. Es wurde eine Bilayer-Ko-Kultur ausgebildet.

Nach den Ergebnissen der Immunfluoreszenz und der TEM führte die Zugabe von 1 μ M Dexamethason nach Erreichen eines fast konfluenten Layers (Tag 3 der Ko-Kultivierung) zur Ausbildung differenzierter Monolayer beider Zell-Linien am Tag 12 der Ko-Kultivierung. NCI H441 bildeten einen kuboidalen Monolayer mit engen Zell-Zell-Kontakten und apikalem Mikrovillisaum

aus, während die ISO-HAS-1 eine typische endotheliale Morphologie mit hervortretender Kernregion und flach auslaufenden Zytoplasmaregion aufwies (Abb. 63B). Die Aufsicht auf die jeweiligen Zell-Layer auf den gegenüberliegenden Seiten der Filtermembran im Rasterelektronenmikroskop zeigte bei Behandlung mit Dexamethason eine lückenlose Zellschicht (nicht gezeigt). Weitere Ergebnisse zur Morphologie der Epithelzell-Linien im Verlauf der Kultur mit und ohne Dexamethason werden für Ko-Kulturen von A549 bzw. NCI H441 mit HPMEC im Kapitel 3.9.3 detaillierter dargestellt und beschrieben.

3.9 Ko-Kultur: Epithelzell-Linien (A549/H441) mit HPMEC

3.9.1 Transzellulärer elektrischer Widerstand (TER) im Verlaufe der Kultur nach Stimulation mit Dexamethason

Wie für die Ko-Kultur der epithelialen Zell-Linien NCI H441 bzw. A549 mit der endothelialen Zell-Linie ISO-HAS-1 wurde der Einfluss von 1 μM Dexamethason auf die Entwicklung der TER-Werte der epithelialen Zell-Linien in Ko-Kultur mit primär isolierten mikrovaskulären Lungenendothelzellen (HPMEC) untersucht.

In Anwesenheit von Serum wurde der TER-Wert für die Ko-Kultur von NCI H441 mit HPMEC durch Dexamethason signifikant erhöht (Tab. 14). Sowohl in Mono- als auch in Ko-Kultur konnten die TER-Werte durch Supplementierung mit 1 μM Dexamethason im Mittel auf $273 \pm 11 \Omega \times \text{cm}^2$ (Mono-Kultur) bzw. $480 \pm 100 \Omega \times \text{cm}^2$ (Ko-Kultur) am Tag 11 der Ko-Kultivierung gesteigert werden. Diese Werte entsprachen einer 6fachen Steigerung für die Mono-Kultur und einer 8fachen Steigerung der TER-Werte für die Ko-Kultur im Vergleich zu den Kulturen ohne Dexamethason.

Tab. 14: Mittlere TER-Werte am Tag 11 der Kultivierung von NCI H441 in Mono-Kultur und Ko-Kulturen von NCI H441 mit HPMEC ohne und mit Dexamethason (1 μM) in RP/MC. $n=18$, 5 verschiedene Experimente

Zellen	TER-Wert [$\Omega \times \text{cm}^2$]	
	unbehandelt	1 μM Dexamethason
NCI H441	44 ± 3	273 ± 11
NCI H441 + HPMEC	56 ± 6	480 ± 100

Da A549 in Ko-Kultur mit der endothelialen Zell-Linie ISO-HAS-1 trotz Zugabe von Dexamethason keine zufriedenstellende Barriere (TER-Werte von $31 \pm 7 \Omega \times \text{cm}^2$) zeigten (siehe Kap. 3.8.2), wurde weiter untersucht, ob die Ko-Kultivierung mit endothelialen Primärzellen (HPMEC) die Differenzierung der A549 positiv beeinflusst.

Hier wurden zusätzlich verschiedene Dexamethason- sowie Serumkonzentrationen und verschiedene Medien getestet. So wurde außer Ko-Kulturmedium, das eine FKS-Anteil von 5% hat, ein für HPMEC optimiertes Kulturmedium, EGM-MV mit bFGF/Heparin (2,5 ng/10 $\mu\text{g/ml}$) (PC-

Medium) und 15% FKS, verwendet. Das ECGM-MV basiert auf einer MCDB 131 Formulierung, hat aber einen geringeren Gehalt an Phenolrot als pH-Indikator.

Weder durch die Variation des Serumgehalts (5%, 15%) noch durch Variation der Dexamethason-Konzentration (0,25 μM bzw. 1 μM) konnte eine signifikante Erhöhung der TER-Werte und damit die Ausbildung eines dichten epithelialen Layers von A549 induziert werden. Auch in Ko-Kultur von A549 mit HPMEC stellten sich nur geringe maximale TER-Werte um $32 \Omega \times \text{cm}^2$ ein.

3.9.2 Proliferation und Expression von Differenzierungsmarkern im Verlauf der Ko-Kultur

Als Nachweis für die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten wurden entweder VE-Cadherin bei HPMEC oder ZO-1 und E-Cadherin bei A549 bzw. NCI H441 Zellen mittels Immunfluoreszenz an Tag 7, Tag 11 und Tag 14 der Kultur nachgewiesen. Da der Aufbau einer intakten zellulären Barriere mit dem Rückgang der proliferativen Aktivität einhergeht, wurde zusätzlich mittels Immunfluoreszenznachweis von Ki67 die Proliferationsaktivität der Zellen beurteilt.

Bei der Ko-Kultur von NCI H441 mit HPMEC konnte ohne Dexamethason-Zugabe keine Ausbildung netzartiger Strukturen von HPMEC nachgewiesen werden, wie sie bei ISO-HAS-1 im Verlaufe der Kultur beobachtet wurde (Kap. 3.8.3). HPMEC bildeten in Ko-Kultur mit NCI H441 sowohl mit als auch ohne Dexamethason bis zum Tag 11 konfluente Monolayer aus (Abb. 64B, D, F, H). Obwohl keine Ausbildung netzartiger Strukturen bei HPMEC feststellbar war, konnten in Abhängigkeit von der Dexamethason-Zugabe Unterschiede im morphologischen Phänotyp der HPMEC gezeigt werden. Bei Ko-Kultur-Bedingungen ohne Dexamethason war das Wachstumsmuster der HPMEC vorwiegend lang gestreckt (Abb. 64B, D), während mit Dexamethason das typische Bild eines regelmäßigen, pflastersteinartigen endothelialen Monolayers zu beobachten war (Abb. 64F, H). Die primär isolierten HPMEC behielten in Ko-Kultur mit NCI H441, unabhängig von der Dexamethason-Zugabe, ihre Fähigkeit zur Ausbildung eines kontaktinhibierten Monolayers mit einer an den Zellgrenzen verstärkten Markierung von VE-Cadherin. Die Markierung mit Ki67 zeigte nur vereinzelt proliferierende Zellen an Tag 7, 11 und 14. Wie bei der Ko-Kultur mit ISO-HAS-1 wurde der morphologische Phänotyp der NCI H441 durch Gabe von 1 μM Dexamethason deutlich beeinflusst. Bereits am Tag 7 befanden sich mit Dexamethason deutlich weniger NCI H441 in einer proliferativen Phase (positiver Nachweis von Ki67) als ohne Dexamethason (Abb. 64A und 64E). Bis zum Tag 11 wurde die reduzierte Proliferation und die Ausbildung eines geordneten Monolayers von einer regelmäßigen Lokalisation des *Tight Junction*-Proteins ZO-1 an den Zellgrenzen der NCI H441 begleitet, während sich ohne Dexamethason Multilayer mit vereinzelter Markierung von ZO-1 ausbildeten (Abb. 64C und 64G).

Bei Ko-Kulturen von A549 mit HPMEC zeigten HPMEC ein vergleichbares Wachstumsverhalten wie bei der Ko-Kultur von NCI H441 mit HPMEC. Bei A549 konnte durch Dexamethason-Zugabe die ZO-1 Expression verstärkt werden, diese verlief jedoch im Vergleich zu NCI H441 nicht als schmales Band an den Zellgrenzen sondern war eher perinukleär bzw. punktiert an den Zellgrenzen zu finden (nicht gezeigt).

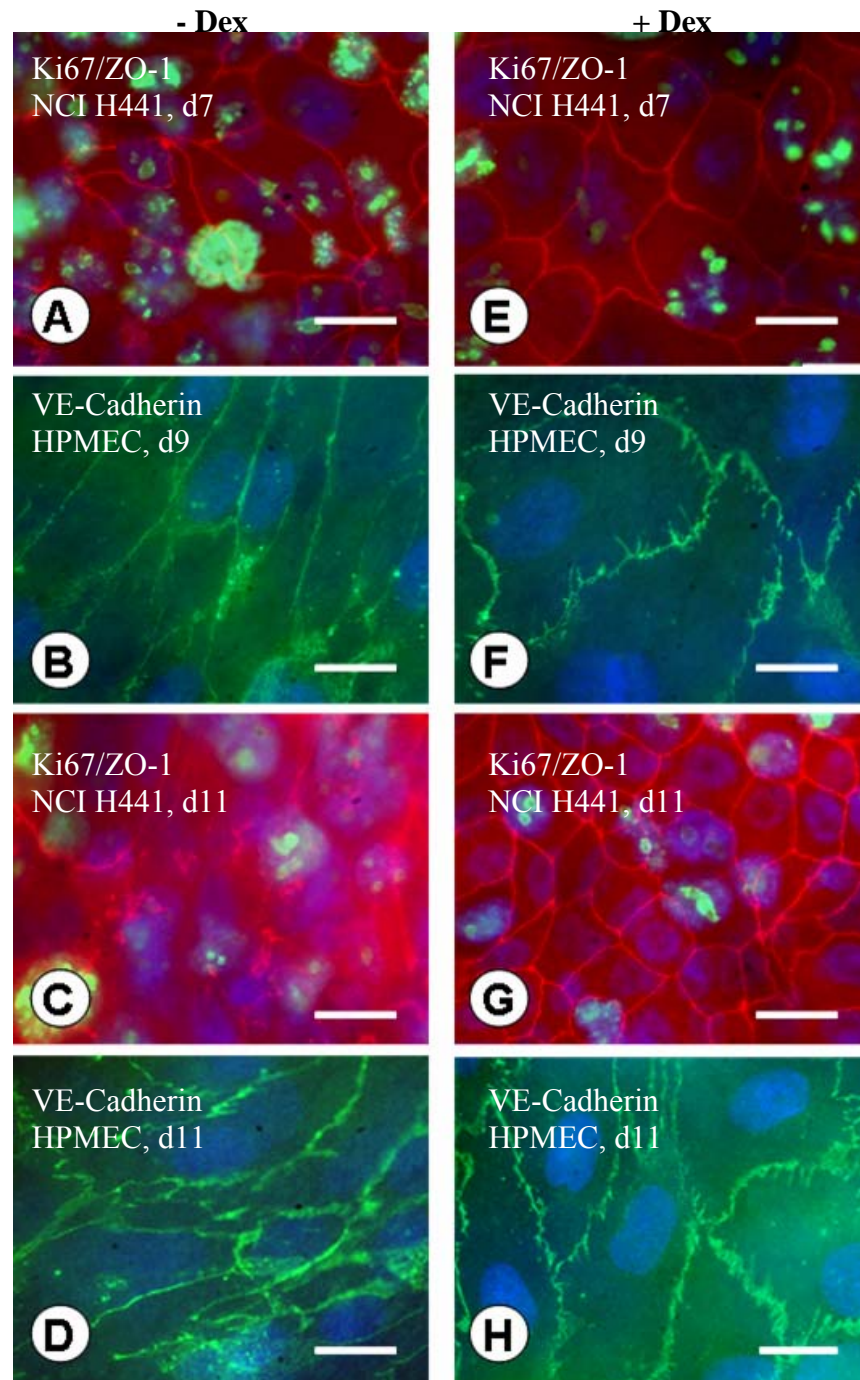


Abb. 64 Expression von Zell-Zell-Kontaktmolekülen und Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 bei Ko-Kulturen von NCI H441 mit HPMEC ohne und mit Dexamethason. Immunfluoreszenz-Markierung einer Ko-Kultur von NCI H441 mit HPMEC auf den oberen bzw. unteren Fläche einer Polycarbonat-Filtermembran, NCI H441 markiert mit anti-ZO-1 (rot) und anti-Ki 67 (grün) an Tag 7 und Tag 11 der Ko-Kultur ohne (A und C) und mit 1 μ M Dexamethason (E und G); HPMEC auf der gegenüberliegenden Seite der Filtermembran markiert mit anti-VE-Cadherin an Tag 7 und Tag 11 der Ko-Kultur ohne (B und D) und mit 1 μ M Dexamethason (F und H). In allen Präparaten Kerngegenfärbung blau, Größenmarkierung = 10 μ m. Mit Dexamethason waren an Tag 11 Monolayer von NCI H441 und HPMEC mit regelmäßigen Zell-Zell-Kontakten und nur noch vereinzelt Ki-67 positive NCI H441 nachweisbar. Ohne Dexamethason waren NCI H441 weiter proliferativ aktiv und HPMEC wuchsen unregelmäßig lang gestreckt, während mit Dexamethason das typische Bild eines regelmäßigen, pflastersteinartigen endothelialen Monolayers zu beobachten war.

3.9.3 Elektronenmikroskopische Untersuchung der etablierten Ko-Kulturen

Der morphologische Phänotyp der Zellen in Ko-Kultur (NCI H441/HPMEC bzw. A549/HPMEC) und die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten bei der Behandlung mit und ohne Dexamethason wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Ko-Kultur untersucht. HPMEC zeigten zu allen untersuchten Zeiten eine flache Morphologie mit hervortretendem Nukleus und langen feinen zytoplasmatischen Ausläufern, die an Kontaktstellen zweier Zellen teilweise überlappten (Abb. 65D). Nach 8 Tagen in Ko-Kultur bildeten sowohl A549 (Abb. 65A) als auch NCI H441 (Abb. 65D) Monolayer mit kuboidaler Morphologie aus. Während A549 am Tag 12, 9 Tage nach Dexamethason-Zugabe, eine abgeflachte Morphologie mit engeren Zell-Zell-Kontakten zeigten (Abb. 65B), blieb die kuboidale Morphologie der NCI H441 erhalten (Abb. 65E).

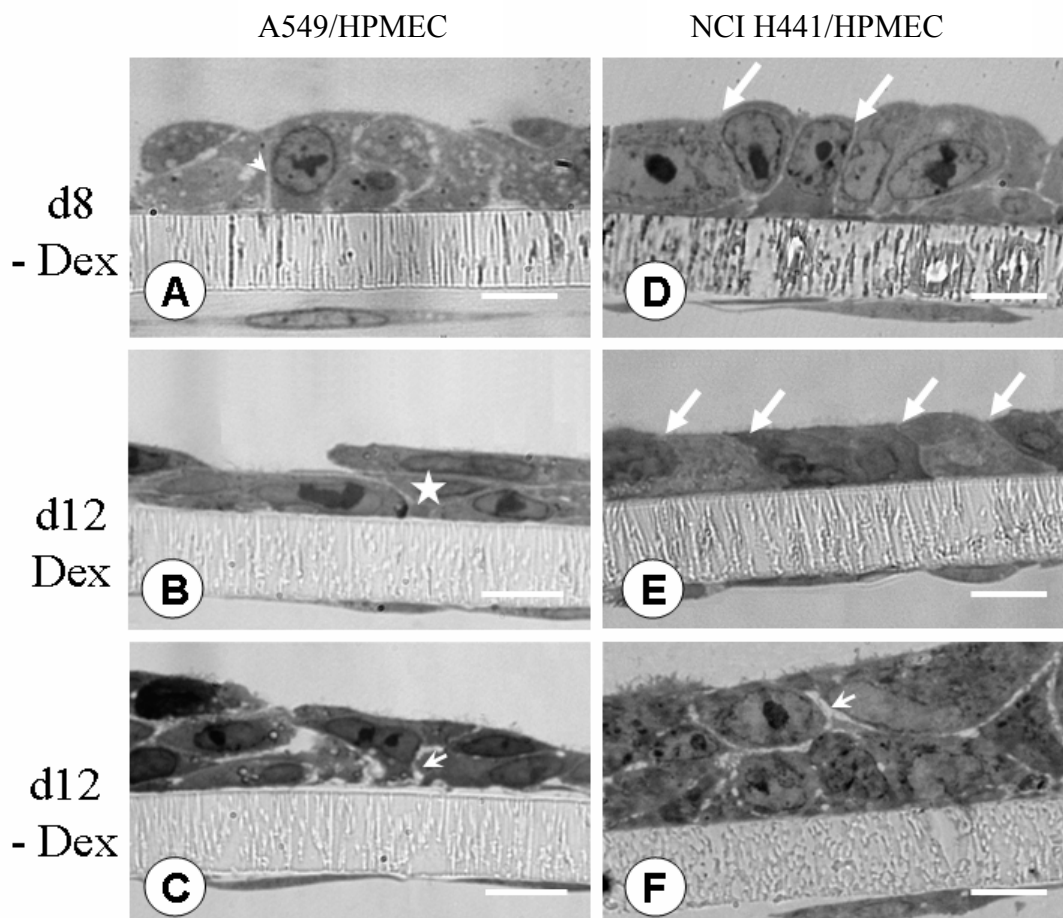


Abb. 65 EM-Bilder von Ko-Kulturen von A549 bzw. NCI H441 Zellen (oben) mit HPMEC (unten) mit und ohne Dexamethason. Ko-Kulturen von A549 und HPMEC ohne Dexamethason Tag 8 (A) und Tag 12 (C) sowie mit 2 μM Dexamethason Tag 12 (B). Ko-Kulturen von NCI H441 und HPMEC ohne Dexamethason Tag 8 (D) und Tag 12 (F) sowie mit 1 μM Dexamethason Tag 12 (E). Semidünnschnitte mit Epithelzellen oben und Endothelzellen unten. Größenmarkierung = 10 μm . Im Vergleich zu unbehandelten NCI H441 (D, Pfeil) zeigen unbehandelte A549 (A, Pfeilspitze) nach 8 Tagen einen weiten parazellulären Zwischenraum. Enge Zell-Zell-Kontakte wurden bei Dexamethason-behandelten A549 (B, Stern) und NCI H441 (E, Pfeile) nach 12 Tagen in Ko-Kultur ausgebildet. An Tag 12 bilden sowohl die unbehandelten A549 (C) als auch die NCI H441 (F) einen lokalen Multilayer mit weiten parazellulären Zwischenräumen aus (C, F, Pfeilspitze).

Weiterhin bildeten NCI H441 mit Dexamethason nach 12 Tagen in Ko-Kultur einen differenzierten Monolayer mit ausgeprägten zellulären Kontakten und einem apikalen Mikrovillisaum aus (Abb. 66B). Ohne Dexamethason formierten sich lokal Multilayer mit einer zweiten bis dritten Schicht an Zellen, die ungeordnet und mit weniger engen Zellkontakten erschien (Abb. 65F). Ein ähnliches Wachstum in mehreren Schichten wurde für A549 ohne Dexamethason am Tag 12 in Ko-Kultur beobachtet (Abb. 65C) wobei auch bei Dexamethason-Zugabe ($2 \mu\text{M}$) lokal eine zweite Schicht von A549 ausgebildet wurde (Abb. 65B). HPMEC auf der gegenüberliegenden Seite der Filtermembran bildeten, unabhängig vom ko-kultivierten Zelltyp (NCI H441 bzw. A549), bei Zugabe von $1 \mu\text{M}$ Dexamethason einen bis zu Tag 12 der Kultivierung konfluenten Zell-Layer mit *Adherens Junctions* aus (Abb. 66C₁-C₃). Vereinzelt waren auch *Tight Junction*-Strukturen (Abb. 66C₂, Stern) bei HPMEC mittels TEM nachweisbar.

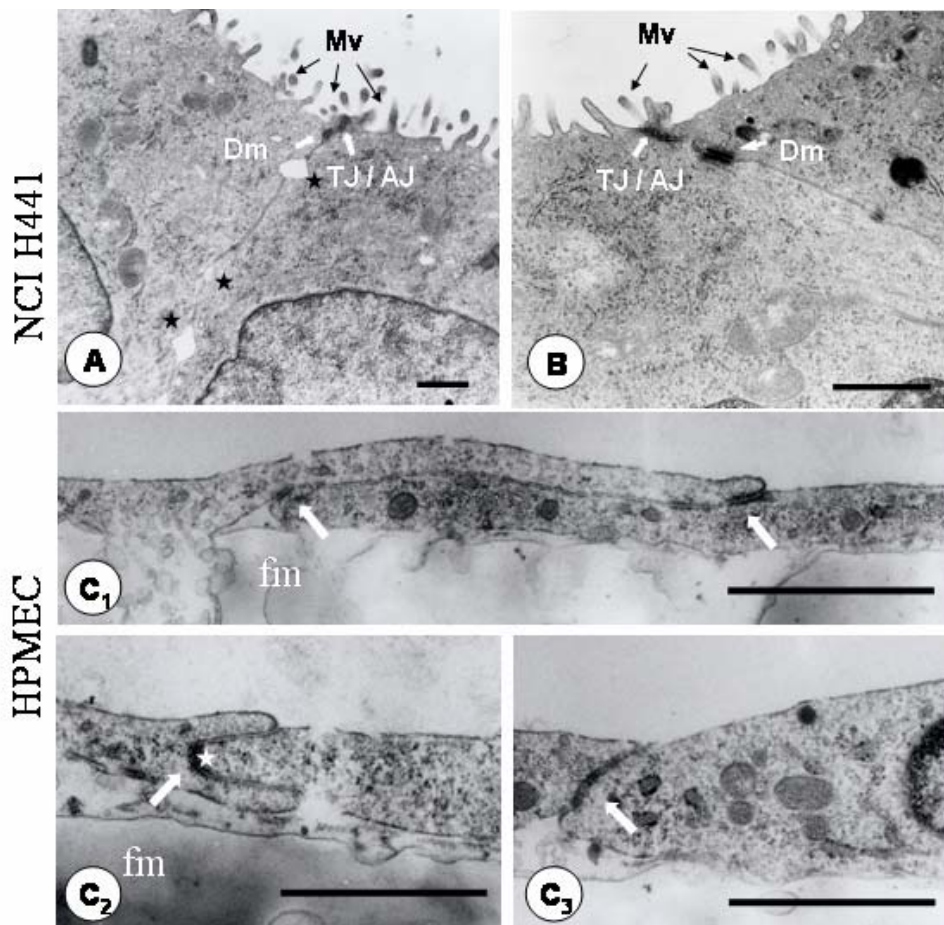


Abb. 66 EM-Bilder der *Tight* und *Adherens Junctions* bei *Bilayer-Ko-Kulturen* von *NCI H441* und *HPMEC* ohne und mit $1 \mu\text{M}$ *Dexamethason*. *NCI H441* bildeten ohne (A) und mit *Dexamethason* (B) an Tag 12 der *Ko-Kultur* einen apikalen junctionalen Komplex aus (*Tight Junctions* (TJ) und *Adherens Junctions* (AJ) begleitet von *Desmosom* (Dm)). Ohne *Dexamethason* waren teilweise auseinander weichende Plasmamembranen nachweisbar (A, Sterne). Mit $1 \mu\text{M}$ *Dexamethason* grenzten die Plasmamembranen benachbarter Zellen lückenlos aneinander (B). Die Vergrößerung der Zell-Zell-Kontakte angrenzender *HPMEC* auf der gegenüber liegenden Seite der Filtermembran (fm) zeigt *Adherens Junctions* (C₁ und C₃, Pfeile) und vereinzelt *Tight Junctions* (C₂, Stern) an Tag 12 der *Dexamethason*-behandelten *Ko-Kultur*. TEM, Größenmarker = $1 \mu\text{m}$

3.10 Parazellulärer Transport von Natrium-Fluoreszein

Die Ausbildung eines dichten Monolayers bzw. Bilayers (Ko-Kultur) wurde im Folgenden funktionell beurteilt. Dazu wurde der parazelluläre Transport des anionischen hydrophilen Markers, Natrium-Fluoreszein, durch Dexamethason-behandelte und unbehandelte Mono-Kulturen von NCI H441 und Bilayer-Ko-Kulturen von NCI H441 mit ISO-HAS-1 bzw. HPMEC ermittelt. Hier wurde der Transport vom oberen zum unteren Well (apikal-basolateral) in RP/MC Medium mit und ohne Dexamethason verglichen. Die Permeabilitäts-Experimente erfolgten parallel zur Etablierung stabiler TER-Werte an Tag 11 der Kultivierung, 8 Tage nach Zugabe von 1 μM Dexamethason.

Für die Dexamethason-behandelte Ko-Kultur wurde für Natrium-Fluoreszein in Krebs-Ringer-Puffer ein mittlerer Permeabilitätskoeffizient (P_{app}) von $0,51 \pm 0,01 \times 10^{-6} \text{ cm/sec}$ bei NCI H441 mit ISO-HAS-1 und $0,81 \pm 0,05 \times 10^{-6} \text{ cm/sec}$ bei NCI H441 mit HPMEC ermittelt (Tab. 15). Im Vergleich zur unbehandelten Ko-Kultur von NCI H441 mit ISO-HAS-1 wurde der Permeabilitätskoeffizient von Natrium-Fluoreszein nach 8tägiger Zugabe von Dexamethason (Kultur 11 Tage) signifikant auf 1/6 bis 1/7 reduziert (Tab. 15). Auch bei der Ko-Kultur NCI H441 mit HPMEC wurde der Permeabilitätskoeffizient von Natrium-Fluoreszein durch Dexamethason-Zugabe signifikant auf ca. 1/3 bis 1/4 des Wertes der unbehandelten Ko-Kultur ($P_{\text{app}} = 3,09 \pm 0,49 \times 10^{-6} \text{ cm/sec}$) reduziert. Desweiteren konnten deutliche Unterschiede im Permeabilitätskoeffizienten von Natrium-Fluoreszein zwischen der Dexamethason-behandelten Mono-Kultur von NCI H441 und den Ko-Kulturen von NCI H441 mit Endothelzellen ermittelt werden. Gegenüber dem Monolayer von NCI H441 wurde der Permeabilitätskoeffizient beim Bilayer von NCI H441 mit ISO-HAS-1 um im Mittel ca. 54% erniedrigt, während dieser beim Bilayer von NCI H441 mit HPMEC um ca. 27% gegenüber dem Monolayer von NCI H441 erniedrigt wurde (Tab. 15).

Tab. 15: Permeabilitätskoeffizienten (P_{app} -Werte) für den Transport von Natrium-Fluoreszein in Krebs-Ringer-Puffer durch Zell-Layer von NCI H441 in Mono-Kultur und in Ko-Kultur mit ISO-HAS-1 bzw. HPMEC. Vorkultur 11 d in RP/MC mit und ohne Dexamethason (Dex). Mittelwert \pm SD ($n = 4$).

Zellkulturen	H441	H441 + Dex	H441/ISO-HAS	H441/ISO-HAS + Dex	H441/HPMEC	H441/HPMEC + Dex
P_{app} ($\times 10^{-6} \text{ cm/sec}$) für Natrium-Fluoreszein	3,65 \pm 0,56	1,11 \pm 0,23	3,54 \pm 0,05	0,51 \pm 0,01	3,09 \pm 0,49	0,81 \pm 0,05

Die vorherigen Kapitel zusammenfassend ließen sich NCI H441 sowohl mit ISO-HAS-1 als auch mit primär isolierten mikrovaskulären Endothelzellen der Lunge (HPMEC) ko-kultivieren. Die Zugabe von 1 μM Dexamethason in serumhaltigem Medium am Tag 3 der Ko-Kultivierung resultierte in der Ausbildung zweier differenzierter Monolayer, dem der NCI H441 und dem der Endothelzellen (ISO-HAS-1 bzw. HPMEC). Das Wachstum der NCI H441 war in RPMI 10% FKS gleichmäßiger als

in Ko-Kulturmedium, was durch geringere Schwankungen im TER-Wert deutlich wurde. Somit wurde der Aufbau eines dichten Bilayers von NCI H441/ISO-HAS-1 bzw. NCI H441/HPMEC mit TER-Werten um $500 \Omega \times \text{cm}^2$ von Tag 10 bis 13 der Ko-Kultur ermöglicht. Funktionell konnte der Aufbau eines dichten Bilayers über den Nachweis eines niedrigen Permeabilitätskoeffizienten von 0,51 bzw. $0,81 \times 10^{-6} \text{ cm/sec}$ bei NCI H441/ISO-HAS-1 bzw. NCI H441/HPMEC bestätigt werden. A549 bildeten weder mit ISO-HAS-1 noch mit HPMEC unter den gewählten Kulturbedingungen einen dichten Layer aus.

3.11 Ko-Kultur von Primärzellen: hATII mit HPMEC

3.11.1 Transzellulärer elektrischer Widerstand (TER) und morphologischer Phänotyp der passagierten hATII* in serumfreien synthetischen Kulturmedien

Untersuchungen zur Ausbildung eines transepithelialen elektrischen Widerstands (TER) *in vitro* sind für hATII Zellen bisher nur in P0 beschrieben. Die verschiedenen Arbeitsgruppen arbeiten dabei mit serumhaltigem Medium mit einem Anteil von 1-10% FKS (Diglio und Kikkawa, 1977; Elbert et al., 1999; Fuchs et al., 2003).

Für die eigenen vergleichenden Untersuchungen mit Ko-Kulturen von ATII-ähnlichen Zell-Linien sollte der Phänotyp der hATII Zellen in Kultur erhalten bleiben und eine Transdifferenzierung, die durch Serumzusatz begünstigte würde, möglichst vermieden werden. Daher wurden die isolierten Zellen in serumfreiem Medium kultiviert, um den Phänotyp der hATII Zellen in Kultur zu erhalten, und der TER-Wert in Verlaufe der *in vitro* Kultur beurteilt. Dazu wurden die Wachstumseigenschaften der hATII unter den bereits für die Zell-Linien ermittelten Kulturbedingungen auf 24-Well-Transwell Filterplatten mit Kollagen Typ 1-Beschichtung in den beiden serumfreien Medien AEGM und SAGM untersucht. Eine konfluente P1 der ungetrennten hATII* wurde mit Collagenase Typ I/EDTA abgelöst und in einer Zellzahl von 5×10^4 Zellen pro cm^2 auf die obere Seite der Filtermembran von 24-Well-Transwell Filterplatten ausgesät. Die TER-Werte wurden anschließend im Verlaufe einer 14tägigen Mono-Kultur auf HTS 24-Transwell Filter-Platten untersucht.

In SAGM zeigten zwei unterschiedliche Spender von hATII* in zweiter Passage (P2) maximale TER-Werte von $150 \pm 29 \Omega \times \text{cm}^2$ bzw. $107 \pm 20 \Omega \times \text{cm}^2$ am Tag 8 respektive Tag 10-12 (Abb. 67B). Dagegen waren in AEGM nur Werte um $11 \pm 2 \Omega \times \text{cm}^2$ messbar (Abb. 67A). Die ermittelten TER-Werte korrelierten mit den elektronenmikroskopischen Bildern der Mono-Kultur (Abb. 68). Das gleiche Epithelzellisolat, in verschiedenen Medien (AEGM, SAGM) kultiviert, zeigte an Tag 14 der Kultivierung kuboidale Zellen mit weitem parazellulären Zwischenraum und ausgeprägtem Mikrovillisaum in AEGM (Abb. 68A, B). Der Zell-Layer war ein bis zweischichtig. Ein lokaler Multilayer mit engeren Zellkontakten und einer flachen zweiten Zellschicht bzw. kugelförmigen Zellaggregaten wurde in SAGM ausgeprägt (Abb. 68C, D). Auffallend waren die vielen vakuolenartigen Strukturen im Zytoplasma der Epithelzellen und die langen Mikrovilli der Zellen in AEGM, die in SAGM wesentlich kürzer waren (Abb. 68B und 68D). Auch waren im Zytoplasma der

in AEGM kultivierten Zellen im Durchschnitt mehr vakuolenartige Strukturen als bei den über 14 Tage in SAGM kultivierten Zellen zu sehen.

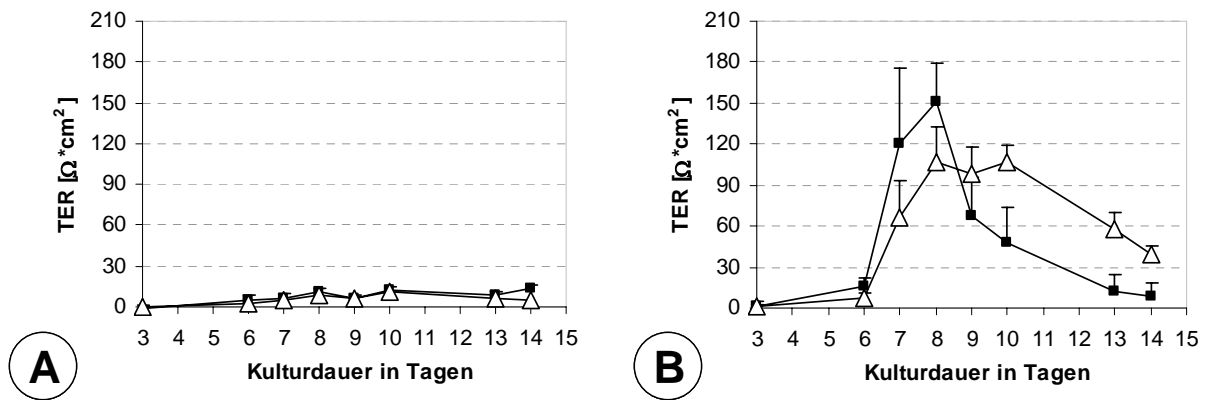


Abb. 67 *Transzellulärer elektrischer Widerstand (TER) von Mono-Kulturen ungetrennter hATII* (P2) in verschiedenen serumfreien Medien. TER-Werte bei Mono-Kulturen verschiedener hATII* (P2) in unterschiedlichen serumfreien Vollmedien AEGM (A) und SAGM (B), hATII* 12-2002 (Δ), hATII* 11-2002 (\blacksquare) (n=4). Vorkultur in AEGM. In SAGM war nach 7-10 Tagen ein leichter Anstieg der TER-Werte messbar, in AEGM wurden keine nennenswerten TER-Werte ausgebildet.*

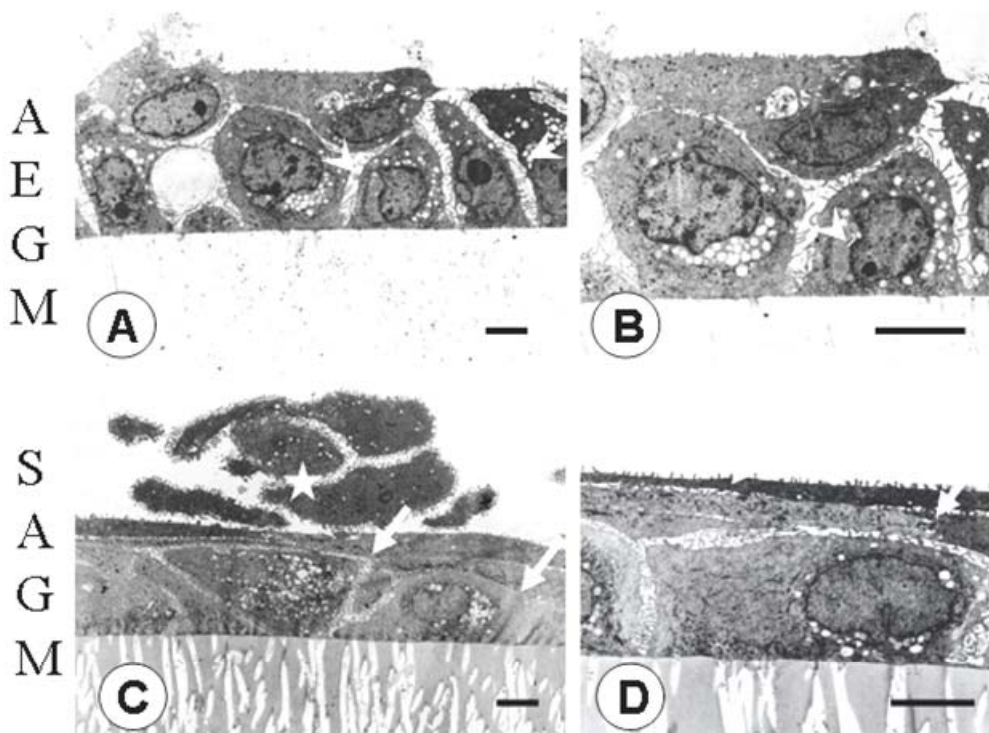


Abb. 68 *EM-Bilder des morphologischen Phänotyps von hATII* (P2) in verschiedenen serumfreien Medien. TEM von Mono-Kulturen des gleichen Isolats von hATII* (P2) an Tag 14 in AEGM (A, B) bzw. SAGM (C, D). Vorkultur bis P1 in AEGM. Größenmarker= 2 μ m. Die hATII Zellen zeigten in AEGM einen weiteren parazellulären Zwischenraum als in SAGM (A, Pfeilspitze und C, Pfeil). In AEGM war nach 14 Tagen in Mono-Kultur ein lokaler Bilayer nachweisbar, die hATII* zeigten eine vermehrte Lipideinlagerung (B, Pfeilspitze). In SAGM wurde ein Multilayers mit einer flachen zweiten Zellschicht (D, Pfeile) bzw. kugelförmigen Zellaggregaten (C, Stern) ausgebildet.*

Die CD44v6 getrennten hATII* wurden ebenfalls erst nach Erreichen der Konfluenz in erster Passage (P1) auf HTS 24 Transwell Filter-Platten ausgesät. TER-Werte von CD44v6⁺ hATII* wurden daher frühestens für die zweite Passage (P2) ermittelt.

Die serumfreien Medien SAGM und AEGM unterschieden sich in der Zusammensetzung der Supplemente nur durch den Zusatz von fettsäurefreiem BSA zu SAGM. Daher wurde die Wirkung von SAGM, AEGM mit BSA und AEGM auf die Entwicklung der TER-Werte bei CD44v6⁺ hATII* untersucht.

In serumfreiem Medium wurde von CD44v6⁺ Zellen in P2 ein maximaler TER-Wert von $65 \pm 16 \Omega \times \text{cm}^2$ am Tag 10 in SAGM erreicht, während AEGM mit und ohne BSA nur Werte um $9 \Omega \times \text{cm}^2$ lieferten (Abb. 69A). Ohne eine vorangegangene Separation zeigten die hATII* des gleichen Spenders maximale TER-Wert von $49 \pm 37 \Omega \times \text{cm}^2$ in SAGM, für AEGM mit und ohne BSA wurden Werte von $9,5 \pm 1,7 \Omega \times \text{cm}^2$ erreicht (Abb. 69B).

In SAGM war die Schwankung der TER-Werte für CD44v6⁺ hATII* in P2 kleiner als die der ungetrennten Zellen des gleichen Spenders in P2. Trotz der geringeren Abweichung der TER-Werte konnten die CD44v6⁺ hATII* wie die ungetrennten hATII* mit maximal $65 \pm 16 \Omega \times \text{cm}^2$ in zweiter Passage keine nennenswerten TER-Werte in serumfreiem Medium aufbauen.

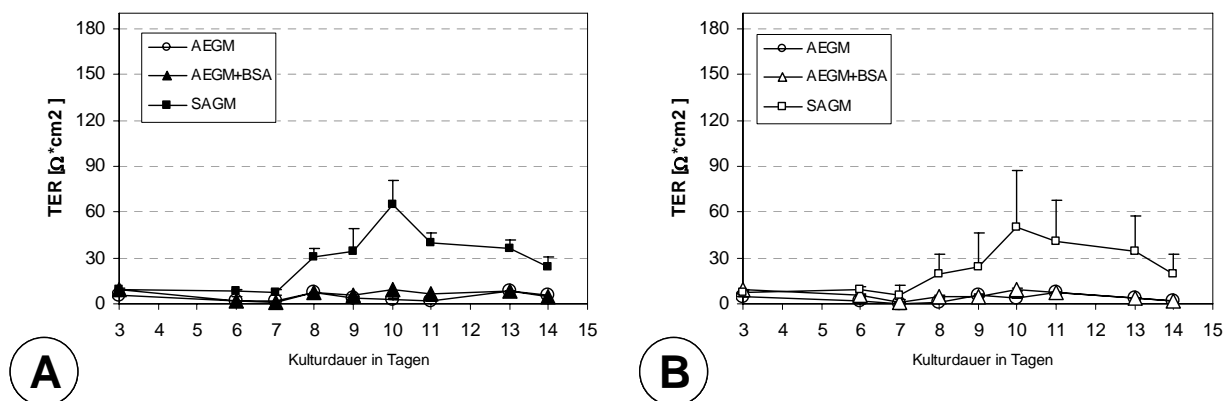


Abb. 69 Transzellulärer elektrischer Widerstand (TER) von Mono-Kulturen der hATII* (P2) CD44v6 getrennt (A) und ungetrennt (B) in verschiedenen serumfreien Medien. TER-Werte im Verlaufe der Kultur bei einem Epithelzellisolat CD44v6 getrennt (A) bzw. ungetrennt (B) in verschiedenen Medien: AEGM (◇), AEGM mit BSA (▲ bzw. △) und in SAGM (■ bzw. □) (n=4). Vorkultur in AEGM. In SAGM war nach 10-13 Tagen ein leichter Anstieg der TER-Werte messbar. In AEGM und AEGM mit bovinem Serumalbumin (BSA) wurden keine signifikanten TER-Werte ausgebildet. Die CD44v6 getrennten hATII* zeigten gleichmäßigere TER-Werte als die ungetrennten hATII*.

Auch durch Zugabe von $1 \mu\text{M}$ Dexamethason konnten die TER-Werte der CD44v6⁺ hATII* in P2 nicht gesteigert werden, obwohl die CD44v6⁺ hATII* (P2) in Mono-Kultur mit Dexamethason in serumfreiem AEGM einen konfluenten Monolayer ausbildeten (siehe Abb. 23, S. 82).

3.11.2 Ko-Kultur von hATII* (P1) mit HPMEC

Zur Aufrechterhaltung des ATII-Phänotyps der epithelialen Primärzellen war serumfreies Medium notwendig, Endothelzellen aber benötigten zumindest in Mono-Kultur einen Serumzusatz zum Kulturmedium, um einen intakten Monolayer zu bilden. Die Ko-Kultur mit Epithelzellen könnte das Wachstum der Endothelzellen durch parakrine Faktoren positiv beeinflussen. Bei der Etablierung der Ko-Kultur der hATII* mit Endothelzellen wurde demnach untersucht, ob die Endothelzellen in Ko-Kultur in serumfreiem Medium konfluente Monolayer ausbildeten.

Um die Differenzierung der hATII Zellen aufrecht zu erhalten wurde überprüft, ob die HPMEC mit hATII Zellen in den serumfreien Vollmedien SAGM und AEGM ko-kultiviert werden konnten. Weiter wurden Ko-Kulturen mit serumfreiem Medium im oberen Well (epitheliale Seite) und serumhaltigem Medium im unteren Well (endotheliale Seite) untersucht. Hier wurde mit EGM-MV, bFGF/Heparin (2,5 ng/10 µg/ml) und 15% FKS (PC 15%) ein für HPMEC optimiertes Kulturmedium im unteren Well eingesetzt. Tabelle 16 fasst alle vier untersuchten Mediumvariationen zusammen.

Tab. 16: *Untersuchte Medienkombinationen zur Ko-Kultivierung von hATII und HPMEC.*

	SAGM	AEGM	SAGM/PC 15% (o/u)	AEGM/PC 15% (o/u)
	komplett serumfrei		serumfrei/serumhaltig	
oberes Well, epitheliale Seite	SAGM	AEGM	SAGM	AEGM
unteres Well, endotheliale Seite	SAGM	AEGM	PC 15% FKS, bFGF/Heparin (2,5 ng/10 µg/ml)	

Zunächst wurden ungetrennte hATII* in erster Passage (P1) in Ko-Kultur mit HPMEC in den serumfreien Medien, SAGM bzw. AEGM, oder in den serumfrei/serumhaltigen Medien, SAGM/PC 15% FKS (o/u) bzw. AEGM/PC 15% FKS (o/u), auf die TER-Werte im Verlaufe der Kultur hin untersucht.

In serumfreiem Medium konnten die ungetrennten hATII* in P1 auch in Ko-Kultur keine nennenswerten TER-Werte aufbauen (Abb. 70A). So wurden am Tag 7 bis Tag 10 maximale TER-Werte von $47 \pm 2 \Omega \times \text{cm}^2$ in SAGM Medium und in AEGM Medium Werte um $17 \Omega \times \text{cm}^2$ gemessen. Wurde im unteren Well das serumhaltige PC 15% FKS verwendet, so konnte im Laufe der Ko-Kultur eine deutliche Zunahme der TER-Werte beobachtet werden. Demgegenüber führte bei Mono-Kulturen von hATII* in P1 ein basolateraler Kontakt mit serumhaltigem Medium nur zu einer leichten Steigerung der TER-Werte (70B). Während sich bei Ko-Kulturen der hATII* in P1 und der Kombination von SAGM/PC 15% FKS (o/u) als Kulturmedium ein Plateau des TER-Wertes um ca. $821 \pm 200 \Omega \times \text{cm}^2$ von Tag 12 bis zum Tag 14 einstellte (Abb. 70A), zeigten Mono-Kulturen der hATII* mit der gleichen Medium-Kombination nur TER-Werte um $80 \Omega \times \text{cm}^2$ (Abb. 70B). Wurde statt SAGM das serumfreie Kulturmedium AEGM im oberen Well eingesetzt (AEGM/PC 15% FKS) schien mit Tag 14 ein Maximum des TER-Wertes mit $1447 \pm 106 \Omega \times \text{cm}^2$ erreicht (Abb. 70A). Bei

Mono-Kulturen mit AEGM im oberen Well und serumhaltigem Endothelzellmedium im unteren Well konnten jedoch nur maximal TER-Werte um $50 \Omega \times \text{cm}^2$ gezeigt werden (Abb. 70B). Zum Aufbau von *Tight Junctions* bei den Epithelzellen war der basolaterale Kontakt mit serumhaltigem Medium alleine nicht ausreichend. Erst die Kombination von serumhaltigem Medium im unteren Well und der Ko-Kultur mit Endothelzellen auf der gegenüberliegenden Seite der Filtermembran führte zu TER-Werten über $800 \Omega \times \text{cm}^2$ nach 12 bis 14 Tagen in Ko-Kultur.

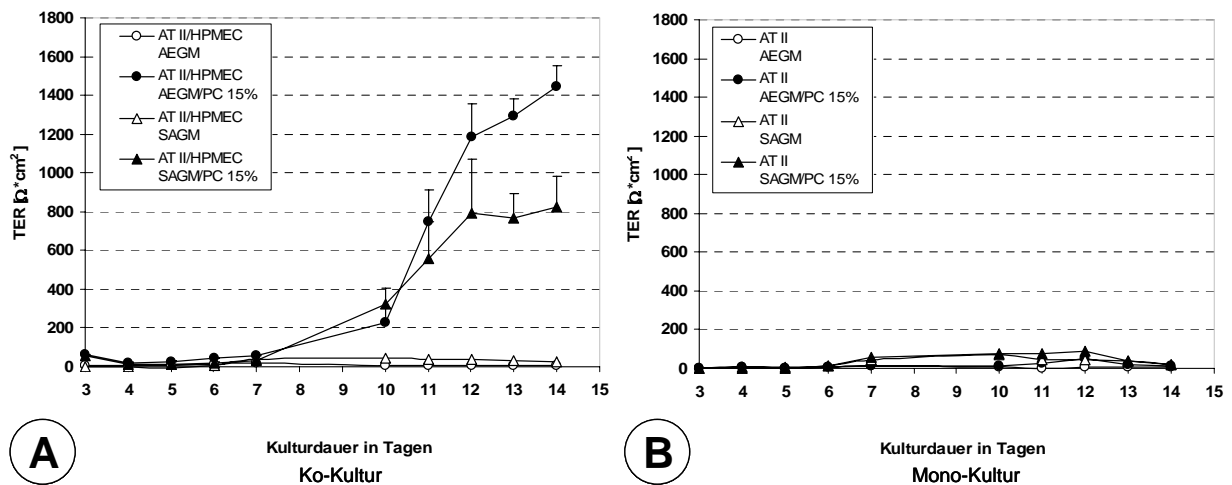


Abb. 70 *Transzellulärer elektrischer Widerstand (TER) von ungetrennten hATII* (P1) in Mono-Kultur und Ko-Kultur mit HPMEC in verschiedenen Medien. TER-Werte im Verlaufe der Kultur bei Ko-Kulturen von ungetrennten hATII* in P1 mit HPMEC (P3) in serumfreien Medien AEGM (○) und SAGM (△) und in serumfreien/serumhaltigen Medien AEGM/PC 15% FKS (o/u) (●) und in SAGM/PC 15% FKS (o/u) (▲). Vorkultur in AEGM (n=4). Ko-Kulturen der hATII* mit HPMEC in SAGM/PC 15% FKS (o/u) zeigten von Tag 12-14 ein Plateau des TER-Wertes, während Mono-Kulturen der hATII* mit der gleichen Medium-Kombination nur TER-Werte um $80 \Omega \times \text{cm}^2$ ausbildeten. Wurde statt SAGM das serumfreie AEGM im oberen Well eingesetzt (AEGM/PC 15% FKS) wurde für die Ko-Kultur an Tag 14 ein maximaler TER-Wert mit $1447 \pm 106 \Omega \times \text{cm}^2$ erreicht. Die Ko-Kultur mit HPMEC und nicht das serumhaltige Medium im unteren Well war für die Ausbildung der hohen TER-Werte verantwortlich.*

An Tag 14 wurden die Ko-Kulturen fixiert und die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten mittels Immunfluoreszenz untersucht. Hier wurde VE-Cadherin für *Adherens Junctions* bei HPMEC sowie ZO-1 und E-Cadherin für *Tight Junctions* bzw. *Adherens Junctions* bei den Epithelzellen auf der jeweiligen Seite der Filtermembran nachgewiesen.

Die ungetrennten Epithelzellen in P1 zeigten für ZO-1 und E-Cadherin in beiden serumfreien Medien SAGM und AEGM eine vereinzelte Markierung (Abb. 71A, B und 72A, B). Am Tag 14 der Ko-Kultur waren in den serumfrei kultivierten Ko-Kulturen nur noch einzelne Kolonien von Endothelzellen auf der gegenüber liegenden Seite der Filtermembran nachweisbar. Dagegen zeigten die Epithelzellen in beiden kombinierten Medien, AEGM/PC 15% FKS (o/u) bzw. SAGM/PC 15% FKS (o/u), eine deutliche Expression von ZO-1 (Abb. 71C bzw. 72C) und E-Cadherin (Abb. 71D bzw. 72D) an den Zell-Zell-Grenzen. HPMEC auf der gegenüber liegenden Seite der Filtermembran

bildeten einen lückenlosen kontakthinhibierten Zell-Layer mit deutlicher Expression von VE-Cadherin an den Zell-Zell-Kontaktstellen benachbarter Zellen (Abb. 71E bzw. 72E).

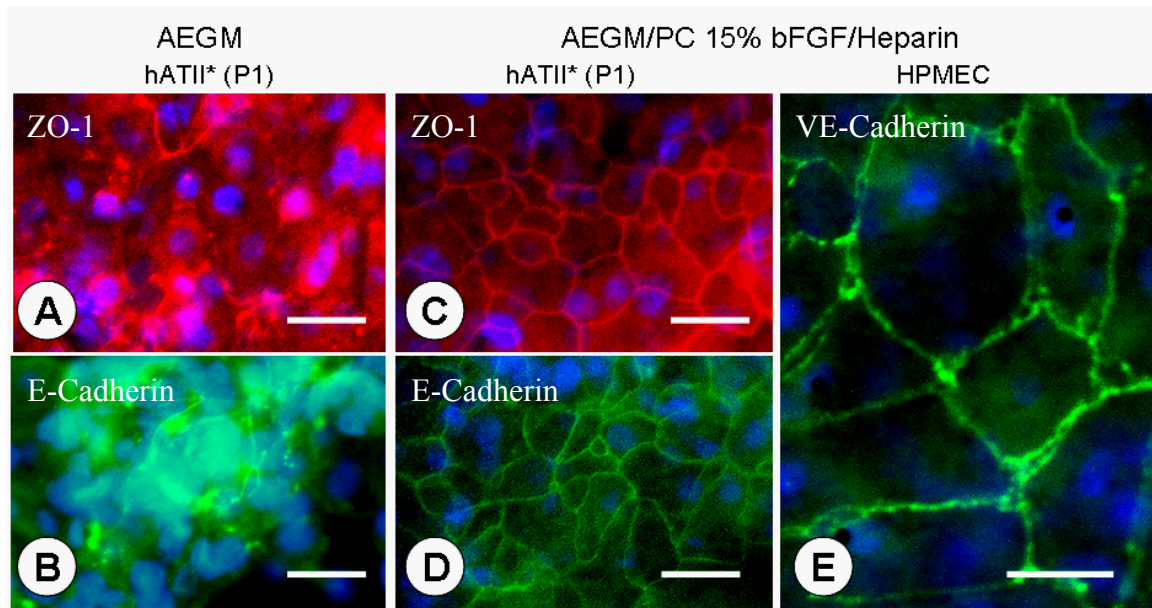


Abb. 71 Expression von Zell-Zell-Kontaktmolekülen bei Ko-Kulturen von hATII* (P1) mit HPMEC in serumfreiem AEGM und kombiniertem Medium (o/u). Immunfluoreszenz-Markierung der Ko-Kultur an Tag 14, hATII* in P1 markiert mit anti-ZO-1 (rot) bzw. anti-E-Cadherin (grün) in serumfreiem AEGM (A bzw. B) und in AEGM/PC 15% FKS (C und D); HPMEC markiert mit anti-VE-Cadherin in AEGM/PC 15% FKS (E). Kerngegenfärbung blau. Größenmarkierung = 10 μ m. Mit AEGM im oberen Well und PC 15% FKS im unterern Well wurde ZO-1 und E-Cadherin deutlich an den Zell-Zell-Grenzen der hATII* exprimiert.

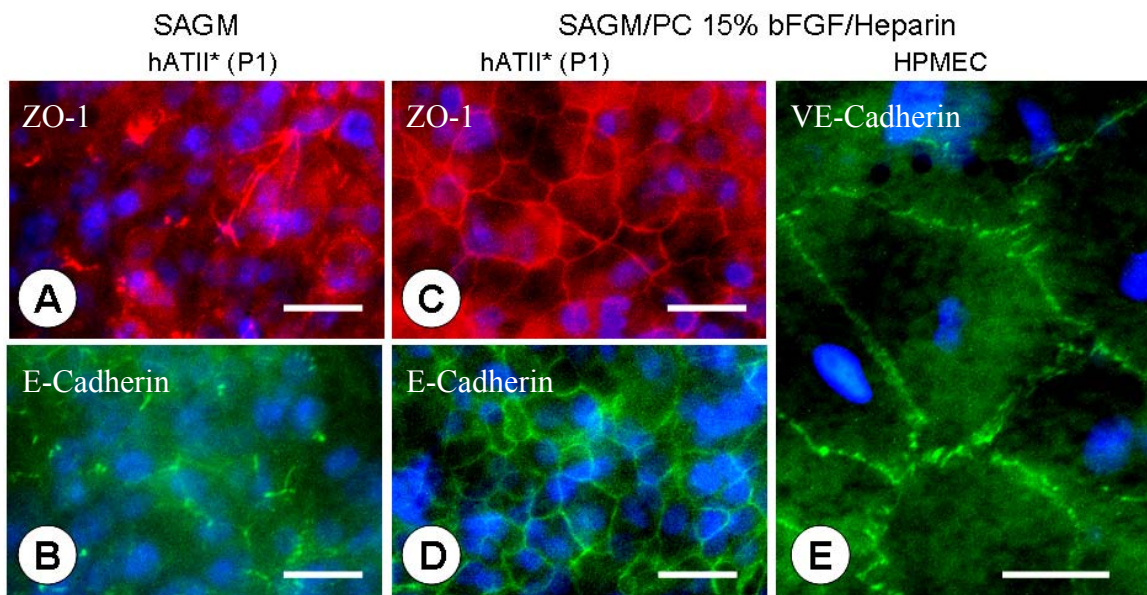


Abb. 72 Expression von Zell-Zell-Kontaktmolekülen bei Ko-Kulturen von hATII* (P1) mit HPMEC in serumfreiem SAGM und kombiniertem Medium (o/u). Immunfluoreszenz-Markierung der Ko-Kultur an Tag 14, hATII* in P1 markiert mit anti-ZO-1 (rot) bzw. anti-E-Cadherin (grün) in serumfreiem SAGM (A bzw. B) und in SAGM/PC 15% FKS (C und D); HPMEC markiert mit anti-VE-Cadherin in SAGM/PC 15% FKS (E). Kerngegenfärbung blau. Größenmarkierung = 10 μ m. Mit SAGM im oberen Well und PC 15% FKS im unterern Well wurde ZO-1 und E-Cadherin deutlich an den Zell-Zell-Grenzen der hATII* exprimiert.

Trotz der Ausbildung von *Tight Junctions* und *Adherens Junctions* war der epitheliale Zell-Layer nicht regelmäßig. Es waren häufig übereinander liegende Zellkerne zu erkennen. Die Untersuchung der Querschnitte der Ko-Kulturen auf Filtermembranen mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) bestätigte das Vorkommen von epithelialen Multilayern.

Am Tag 14 der Ko-Kultur in serumfreien Medien war die Oberseite der Filtermembran mit einem zwei- bis dreischichtigen Layer von Epithelzellen bewachsen (Abb. 73A und C). Hier fand man keine oder nur noch einzelne Kolonien von Endothelzellen auf der gegenüber liegenden Seite der Filtermembran (Abb. 73A und C). Bei Einsatz des serumhaltigen Endothelzellmediums (PC 15%) im unteren Well wurde dagegen eine lückenlose Endothelzellschicht auf der Unterseite der Filter nachgewiesen (Abb. 73B und D). Während in AEGM/PC 15% FKS ein Multilayer von Epithelzellen ausgebildet wurde (Abb. 73D), konnte in SAGM/PC 15% FKS zumindest partiell die Ausbildung eines Monolayers von Epithelzellen in Ko-Kultur mit HPMEC erreicht werden (Abb. 73D).

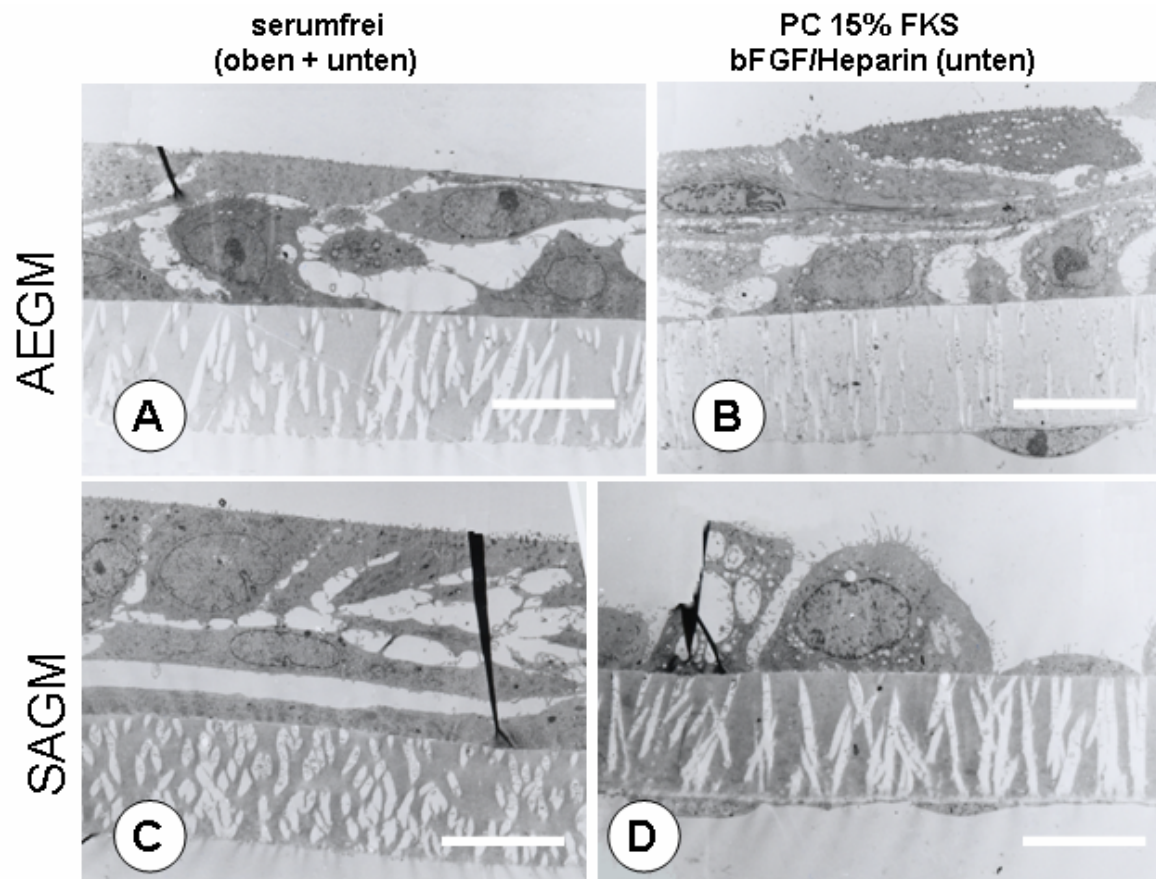


Abb. 73 EM-Bilder von Ko-Kulturen von hATII* (P1) mit HPMEC in verschiedenen Medien. TEM von Querschnitten einer Bilayer-Ko-Kultur der gleichen von hATII* (P1) mit HPMEC (P3) an Tag 14, kultiviert in AEGM (A), AEGM/PC 15% FKS (B), SAGM (C) und SAGM/PC 15% FKS (D). Vorkultur in AEGM, Größenmarker=1 μ m. In beiden serumfreien Medien, AEGM und SAGM wurde ein Multilayer von Epithelzellen mit weiten parazellulären Zwischenräumen ausgebildet, die Zellschicht der HPMEC fehlte (A, C). Bei Ko-Kulturen mit PC 15% FKS im unteren Well (B, D) waren Monolayer von HPMEC nachweisbar. In AEGM/PC 15% FKS entwickelte sich ein epithelialer Multilayer (B) während in SAGM/PC 15% FKS lokal ein epithelialer Monolayer ausgebildet wurde (D).

Gleichmäßig hohe TER-Werte von über $800 \Omega \times \text{cm}^2$ ließen sich in Ko-Kultur mit HPMEC und nur bei sehr reinen hATII* Zellisolaten in P1 erzielen. Häufig waren große Schwankungen innerhalb der einzelnen Transwells der HTS 24-Transwell Filter-Platte messbar. Die anschließende Färbung der Zell-Zell-Verbindungen mittels Immunfluoreszenz zeigte, dass Areale von ZO-1 und E-Cadherin negativen Zellen mit spindelförmiger Morphologie in den Wells, die zuvor geringe TER-Werte hatten, vorkamen (nicht gezeigt). Die Ko-Kultur mit HPMEC oder der höhere Serumzusatz förderten demnach das Wachstum kontaminierender Fibroblasten in den Isolaten von hATII*. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob mit Hilfe einer reineren Epithelzellpopulation nach positiver Selektion mit CD44v6-Beads gleichmäßigere TER-Werte erzielt werden können. Wie bereits im vorherigen Kapitel erwähnt, wurden die CD44v6⁺ Zellen erst nach Erreichen der Konfluenz, demnach in P2, in die Mono- und Ko-Kulturen eingesetzt.

3.11.3 Ko-Kultur von hATII* (P2) mit HPMEC

Nach den elektronenmikroskopischen Befunden bildeten die hATII* (P1) in Ko-Kultur mit HPMEC eher Monolayer aus, wenn SAGM im oberen Well und PC 15% FKS im unteren Well verwendet wurde. Da die gesamte Charakterisierung der phänotypischen Eigenschaften der hATII* in AEGM durchgeführt wurde, wurde trotz der guten Ergebnisse mit SAGM für die weitere Ko-Kultur AEGM im oberen Well und PC 15% FKS im unteren Well verwendet. Im Folgenden wurde weiter versucht, durch Variation der Kulturbedingungen einen epithelialen Monolayer in AEGM/PC 15% FKS (o/u) zu erhalten. Da die Zugabe von $1 \mu\text{M}$ Dexamethason die Ausbildung eines kontakt-inhibierten Monolayers der CD44v6⁺ hATII* (P2) in Mono-Kultur förderte (Abb. 23, S. 82), wurde auch in Ko-Kultur mit HPMEC der Einfluss von Dexamethason auf die Ausbildung eines kontakt-inhibierten Monolayers von CD44v6⁺ hATII* (P2) untersucht.

In Ko-Kultur wurden für CD44v6⁺ hATII* (P2) mit HPMEC in AEGM/PC 15% FKS (o/u) ohne Dexamethason nach 13-14 Tagen TER-Werte über $1000 \Omega \times \text{cm}^2$ erreicht (Abb. 74A). Für die ungetrennten Epithelzellen des gleichen Isolats in P2 waren TER-Werte um $600 \Omega \times \text{cm}^2$ mit wesentlich höheren Schwankungen zwischen den einzelnen Filterkulturen ($672 \pm 270 \Omega \times \text{cm}^2$) messbar (Abb. 74B). Mit Dexamethason wurden maximale TER-Werte von $1580 \pm 150 \Omega \times \text{cm}^2$ am Tag 14 erreicht (Abb. 74A). Unter gleichen Bedingungen zeigten die Mono-Kulturen der CD44v6⁺ hATII* (P2) in AEGM/PC 15% FKS (o/u) keine nennenswerten TER-Werte (Abb. 74A).

In zweiter Passage (P2) wurde für ungetrennte wie für CD44v6⁺ hATII* mit und ohne Zugabe von $1 \mu\text{M}$ Dexamethason in AEGM/PC 15% FKS (o/u) eine ausgeprägte Expression von ZO-1 und E-Cadherin an den Zell-Zell-Grenzen der hATII* in Ko-Kultur nachgewiesen. HPMEC auf der gegenüber liegenden Seite des Filters wuchsen, wie in Ko-Kultur mit hATII* in erster Passage (P1), in serumhaltigem Endothelzellmedium (PC 15%) lückenlos (nicht gezeigt). Im Gegensatz zu den in serumfreiem AEGM kultivierten CD44v6⁺ hATII* (P2) in Mono-Kultur (siehe Kapitel 3.2.5) konnte bei der Ko-Kultur der CD44v6⁺ hATII* (P2) mit HPMEC die Ausbildung eines Monolayers von hATII* durch Zugabe von $1 \mu\text{M}$ Dexamethason nicht induziert werden.

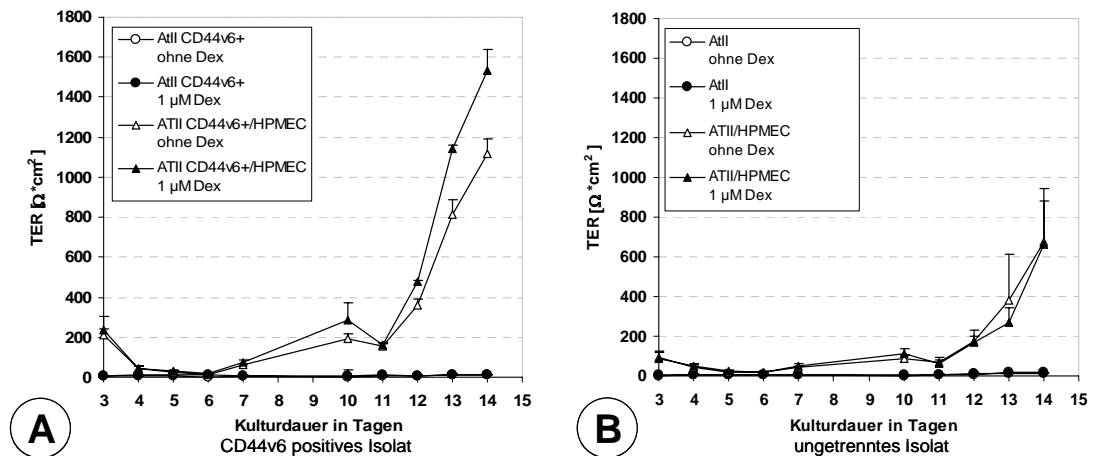


Abb. 74 Transzellulärer elektrischer Widerstand (TER) von $CD44v6^+$ $hATII^*$ Zellen (A) und ungetrennten $hATII^*$ Zellen (B) in P2 in Mono- und Ko-Kultur mit HPMEC. TER-Werte im Verlaufe der Kultur bei $CD44v6^+$ $hATII^*$ (A) und ungetrennten $hATII^*$ (B) eines Spenders in P2 in Mono-Kultur bzw. Ko-Kultur mit HPMEC (P4) in AEGM/PC 15% FKS (o/u). Mono-Kultur ohne (○) und mit $1 \mu\text{M}$ Dexamethason (●) bzw. Ko-Kultur ohne (△) und mit $1 \mu\text{M}$ Dexamethason (▲). Vorkultur in AEGM ($n=4$). Die Mono-Kulturen der $hATII^*$ bildeten keine nennenswerten TER-Werte aus. Die $CD44v6$ getrennten $hATII^*$ zeigten in Bilayer-Ko-Kultur höhere und gleichmäßigere TER-Werte als die ungetrennten $hATII^*$ in Bilayer-Ko-Kultur. Mit $1 \mu\text{M}$ Dexamethason wurden maximale TER-Werte von $1580 \pm 150 \Omega \times \text{cm}^2$ am Tag 14 der Bilayer-Ko-Kultur erreicht.

Wie in P1 bildeten die in serumfrei/serumhaltigem AEGM/PC 15% FKS (o/u) ko-kultivierten ungetrennten sowie die $CD44v6^+$ $hATII^*$ Zellen in P2 trotz Zugabe von Dexamethason nach 14 Tagen epitheliale Multilayer aus. Vom morphologischen Phänotyp waren auf der epithelialen Seite kuboidale Zellen mit vielen vakuolenartigen Strukturen nachweisbar. Die Epithelzellen bildeten zwar mit serumfreiem Medium im oberen Well und serumhaltigem Medium im unteren Well in Ko-Kultur dichte Zell-Zell-Kontakte aus, der Zell-Layer zeigte sich aber immer zwei bis dreischichtig (nicht gezeigt).

Die Ergebnisse der vorangegangenen Kapitel zusammenfassend war bei der Ko-Kultur der passagierten $hATII^*$ mit HPMEC für die Ausbildung von *Tight Junctions* bei den Epithelzellen die Ko-Kultur mit primären Endothelzellen in serumhaltigem Kulturmedium notwendig. In Ko-Kultur konnten für $CD44v6^+$ $hATII^*$ (P2) im Vergleich zu ungetrennten Isolaten höhere und gleichmäßigere TER-Werte ermittelt werden. Die Gabe von $1 \mu\text{M}$ Dexamethason steigerte zusätzlich den TER-Wert der Ko-Kulturen. Trotz teils wiederhergestellter TER-Werte waren die passagierten $hATII^*$ in Ko-Kultur mit HPMEC unter den gewählten Kulturbedingungen auf Kollagen Typ 1 beschichteten Polycarbonat-Filtermembranen nicht mehr in der Lage, einen streng kontaktinhibierten Monolayer auszubilden. Auch die Zugabe von $1 \mu\text{M}$ Dexamethason konnte die Ausbildung eines kontaktinhibierten epithelialen Monolayers in Ko-Kultur nicht induzieren.

3.11.4 Ko-Kultur von hATII (P0) mit HPMEC

Um als Referenz für das Ko-Kultur Modell der Zell-Linien zu dienen, sollten für die Ko-Kultur der Primärzellen möglichst viele Eigenschaften der Zellen *in vivo* auch in Kultur beibehalten werden. Die passagierten hATII* bildeten in Ko-Kultur mit HPMEC zwar dichte Zell-Zell-Verbindungen aus, unter den gewählten Kulturbedingungen konnte jedoch keine Differenzierung der Epithelzellen zu einem strikten Monolayer, wie er *in vivo* ausgebildet wird, erreicht werden. Außerdem verloren die zunächst viele hATII-typische Eigenschaften zeigenden hATII* im Verlaufe der Passagen viele dieser Merkmale (Kap. 3.2.3). Diese Beobachtungen könnten auf einer Dedifferenzierung der passagierten hATII Zellen beruhen, obwohl auch eine Vermehrung eines anderen epithelialen Zelltyps aufgrund des Verlusts vieler Marker von hATII Zellen nicht ganz ausgeschlossen werden konnte.

Um die schnelle Dedifferenzierung der Epithelzellen im Verlaufe der Passagen zu vermeiden, musste daher als Kompromiss eine Bilayer-Ko-Kultur von HPMEC mit hATII Zellen in P0, mit einem Anteil von ca. 93-95% hATII Zellen (siehe Kap. 3.1.2), etabliert werden. Da hATII Zellen in P0 verwendet werden mussten, konnten HPMEC und hATII Zellen nicht vom gleichen Spender ko-kultiviert werden, da für die Aufreinigung und Vermehrung der HPMEC ein Zeitraum von 10-14 Tagen in Kultur benötigt wurde.

Die Epithelzellen wurden direkt nach der Isolation in einer Zelldichte von $2,4 \times 10^5$ Zellen/cm² auf die Oberseite von HTS 24-Transwell Filter-Platten, auf denen bereits auf der Rückseite HPMEC (5×10^4 Zellen/cm²) ausgesät waren, ko-kultiviert. Weiter wurden zwei Kulturbedingungen verglichen: (a) die Kultivierung in SAGM mit 1% FKS (Fuchs et al., 2003), die zu einer Transdifferenzierung der Zellen zu einem hATI-ähnlichen Phänotyp mit hohen TER-Werten in Mono-Kultur führte und (b) die für die Kultivierung der selbst isolierten hATII Zellen ausgewählten Bedingungen, in serumfreiem AEGM Medium. Im unteren Well wurde ausschließlich ein für HPMEC optimiertes Kulturmedium, EGM-MV mit bFGF/Heparin (2,5 ng/10 µg/ml) (PC-Medium) und 15% FKS, eingesetzt.

Zunächst wurde die Ausbildung einer dichten epithelialen Zellschicht über die Messung der TER-Werte untersucht. Dazu wurden die hATII Zellen (P0) in Bilayer-Ko-Kultur (ATII P0/HPMEC) mit SAGM 1% bzw. AEGM im oberen Well kultiviert. Zusätzlich wurde auch für die Mono-Kultur der hATII Zellen (ATII P0) die Ausbildung eines dichten Monolayers mittels TER mit SAGM 1% FKS im oberen Well und Endothelzellmedium im unteren Well kontrolliert. Da außer dem direkten Kontakt von Endothel- und Epithelzellen lösliche Faktoren der HPMEC einen Einfluss auf die TER-Werte der Epithelzellen in Ko-Kultur haben konnten, wurde ein weiterer Ko-Kultivierungstyp untersucht. Hier wurden die HPMEC, anders als bei der Bilayer-Ko-Kultur auf der Unterseite der Filtermembran, auf dem Boden der Transwell Cluster-Platten ausgesät. Dadurch war die gegenseitige Beeinflussung der Epithel- und Endothelzellen möglich ohne in Ko-Kultur einen Bilayer auszubilden. Da auf der Filtermembran nur ein Monolayer von hATII Zellen wuchs, waren die gemessenen TER-Werte alleine abhängig von den Epithelzellen (ATII P0 + HP). Hier wurde entsprechend der Mono-Kultur, SAGM mit 1% FKS als Kulturmedium im oberen Well und PC 15% FKS im unteren Well eingesetzt.

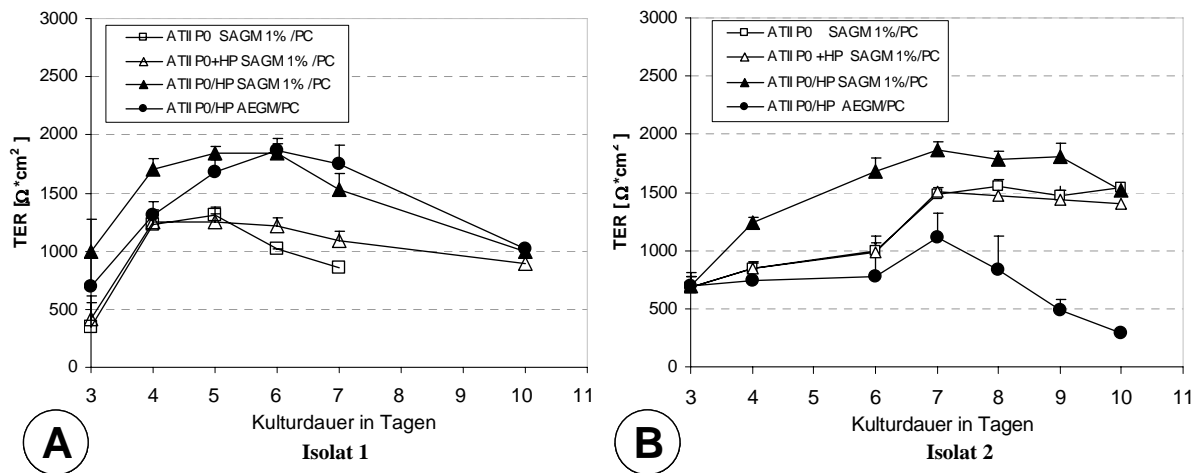


Abb. 75 *Transzellulärer elektrischer Widerstand (TER) von Primärkulturen von hATII Zellen (P0, zwei Isolate) in Mono- und Ko-Kultur mit HPMEC in kombinierten Medien. TER bei Mono-Kulturen von hATII Zellen in P0 (□) und Ko-Kulturen desselben hATII Zell-Isolats mit HPMEC (P3) wobei die hATII Zellen auf der Oberseite der Filtermembran und HPMEC auf dem Boden der 24-Well-Cluster-Platte (ATII P0 + HP, △) kultiviert wurden. Ko-Kulturen auf beiden Seiten der Filtermembran (Bilayer-Ko-Kultur) in kombiniertem Medium SAGM 1% FKS/PC 15% FKS (o/u) (ATII/HP, ▲) bzw. in serumfreiem AEGM/PC 15% FKS (o/u) (ATII/HP, ●) kultiviert (n=6). Die Primärkulturen der hATII bildeten, unabhängig davon ob HPMEC auf dem Boden der 24-Well-Cluster-Platte kokultiviert wurden, TER-Werte von 1300-1500 $\Omega \times \text{cm}^2$ aus. Die Bilayer-Ko-Kultur von hATII und HPMEC zeigte 20-40% höhere TER-Werte als die Ko-Kultur mit einem Monolayer der hATII auf der Filtermembran. Die Kombination von SAGM mit 1% FKS im oberen Well und PC mit 15% FKS im unteren Well führte zu einer gleichmäßigen Ausbildung hoher TER-Werte nach 6-10 Tagen in Bilayer-Ko-Kultur.*

In Abbildung 75 dargestellt sind die TER-Werte im Verlaufe der Kultur von zwei Primärisolaten verschiedener Spender (Abb. 75A, B). Die als Monolayer auf der Filtermembran wachsenden Kulturen der hATII Zellen (Abb. 75 □ und △) zeigten in Mono- und in Ko-Kultur bei beiden Isolaten ähnliche maximale TER-Werte um 1300-1500 $\Omega \times \text{cm}^2$. Die Ko-Kultivierung mit HPMEC auf dem Boden der 24-Well-Cluster-Platte hatte keinen signifikanten Einfluss auf die TER-Werte der hATII Zellen. Demgegenüber waren die TER-Werte beider Bilayer Ko-Kulturen (Zellen auf beiden Seiten der Filtermembran) bereits nach 4 Tagen in Ko-Kultur signifikant höher als die TER-Werte der hATII Zellen als Monolayer auf der Filtermembran (Abb. 75 ▲, ● und □ und △).

Mit AEGM im oberen Well und PC 15% FKS im unteren Well (AEGM/PC 15% FKS (o/u)) zeigten die verschiedenen Isolate in Ko-Kultur deutlich unterschiedliche TER-Werte über den Kultivierungszeitraum von 10 Tagen. Das Isolat A erreichte in AEGM/PC 15% FKS (o/u) ähnlich hohe TER-Werte wie in SAGM 1% FKS/PC 15% FKS (o/u) um maximal $1870 \pm 97 \Omega \times \text{cm}^2$ (Abb. 75A), während beim Isolat B maximale TER-Werte von $1868 \pm 72 \Omega \times \text{cm}^2$ in SAGM 1% FKS/PC 15% FKS (o/u) erreicht wurden, die TER-Werte in AEGM/PC 15% FKS (o/u) jedoch unter $1000 \Omega \times \text{cm}^2$ lagen (Abb. 75B).

Vergleicht man die Bilayer Ko-Kulturen der beiden Isolate so wurden unter den verschiedenen Kulturbedingungen die stabilsten TER-Werte von Tag 5 bis Tag 9 mit Werten um $1800 \Omega \times \text{cm}^2$ in SAGM 1% FKS/PC 15% FKS (o/u) erhalten (Abb. 75A und B, ▲).

Die maximal erreichten TER-Werte der Bilayer-Ko-Kultur lagen im Mittel um $300\text{-}500 \Omega \times \text{cm}^2$ höher als die der Monolayer Ko-Kultur (Ko-Kultivierung von hATII mit HPMEC auf dem Boden der 24-Well-Cluster-Platte) und der Mono-Kultur der hATII Zellen (Abb. 75A, B und Abb. 76B). In SAGM 1% FKS/PC 15% FKS (o/u) wurden TER-Wert-Differenzen von bis zu $1500 \Omega \times \text{cm}^2$ zwischen der Bilayer-Ko-Kultur von hATII mit HPMEC und der Mono-Kultur von hATII cm^2 gemessen (Abb. 76A).

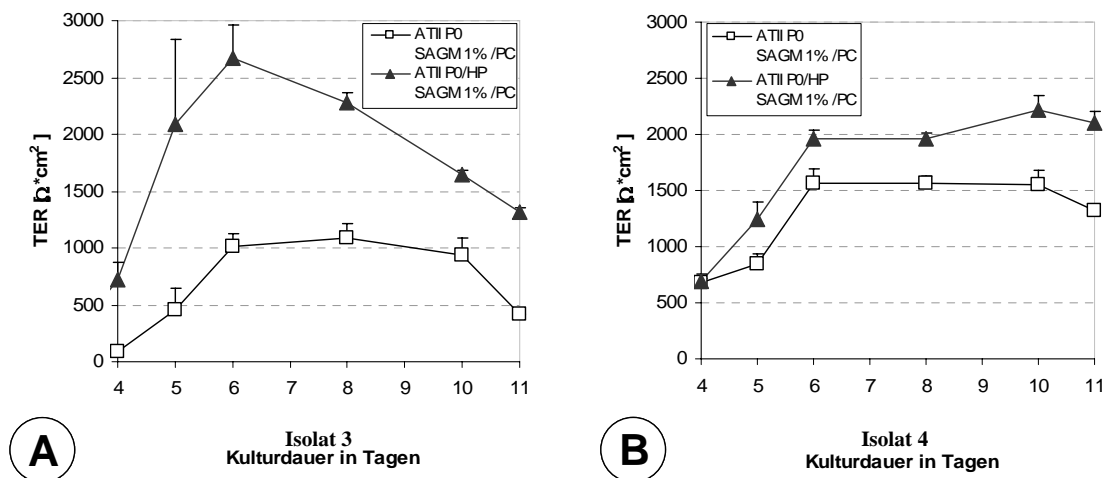


Abb. 76 Transzellulärer elektrischer Widerstand (TER) von Primärkulturen von hATII Zellen (P0, zwei Isolate) in Mono- und Ko-Kultur mit HPMEC. TER bei Mono-Kulturen von hATII Zellen in P0 (\square) und Ko-Kulturen desselben hATII Zell-Isolats mit HPMEC (P3) auf beiden Seiten der Filtermembran in SAGM 1% FKS/PC 15% FKS (o/u) (ATII/HP, \blacktriangle) ($n=5$). Die Primärkulturen der hATII bildeten von Tag 6 bis 10 maximale TER-Werte um $1000 \Omega \times \text{cm}^2$ bzw. $1500 \Omega \times \text{cm}^2$ aus. Im Vergleich zur Mono-Kultur wurden bei Bilayer-Ko-Kulturen desselben hATII Zell-Isolats mit HPMEC bis zu $1500 \Omega \times \text{cm}^2$ höhere TER-Wert gemessen (siehe Isolat 3). Die Bilayer-Ko-Kultur des Isolats 4 zeigte 20-40% höhere TER-Werte als die Mono-Kultur derselben hATII Zellen. Die TER-Werte waren von Tag 6 bis Tag 10 stabil.

Der morphologische Phänotyp der Bilayer Ko-Kulturen in SAGM mit 1% FKS (Abb. 77A, B, C) bzw. AEGM (Abb. 77D, E, F) im oberen Well wurde am Tag 3, Tag 5 und Tag 7 der Ko-Kultur anhand einer zytochemischen Färbung mit H/E (Hämalaun, Kerne blau/Eosin, Zytoplasma rot) lichtmikroskopisch beurteilt. Von Tag 3 bis Tag 7 änderte sich bei der Ko-Kultur in SAGM 1% FKS/PC 15% FKS (o/u) der morphologische Phänotyp der Epithelzellen kaum. Es waren meist kuboidale Epithelzellen mit heller erscheinenden vakuolenartigen Strukturen im apikalen Zytoplasma und vereinzelt flacher gestreckte Zellen mit wenig Zelleinschlüssen in SAGM 1% FKS nachweisbar. Die Epithelzellen der Ko-Kultur in AEGM/PC 15% FKS (o/u) zeigten einen den Zellen in SAGM 1% FKS ähnlichen morphologischen Phänotyp. An Tag 7 der Ko-Kultur waren in AEGM jedoch im Vergleich zu SAGM 1% FKS vermehrt Areale mit mehrschichtig wachsenden Zellen nachweisbar (Abb. 77F). Die Endothelzellen auf der gegenüberliegenden Seite der Filtermembran bildeten einen

kontaktinhibierten lückenlosen Monolayer. Die sehr flachen Endothelzellen waren oft nur durch ihre hervortretende Kernregion zu erkennen.

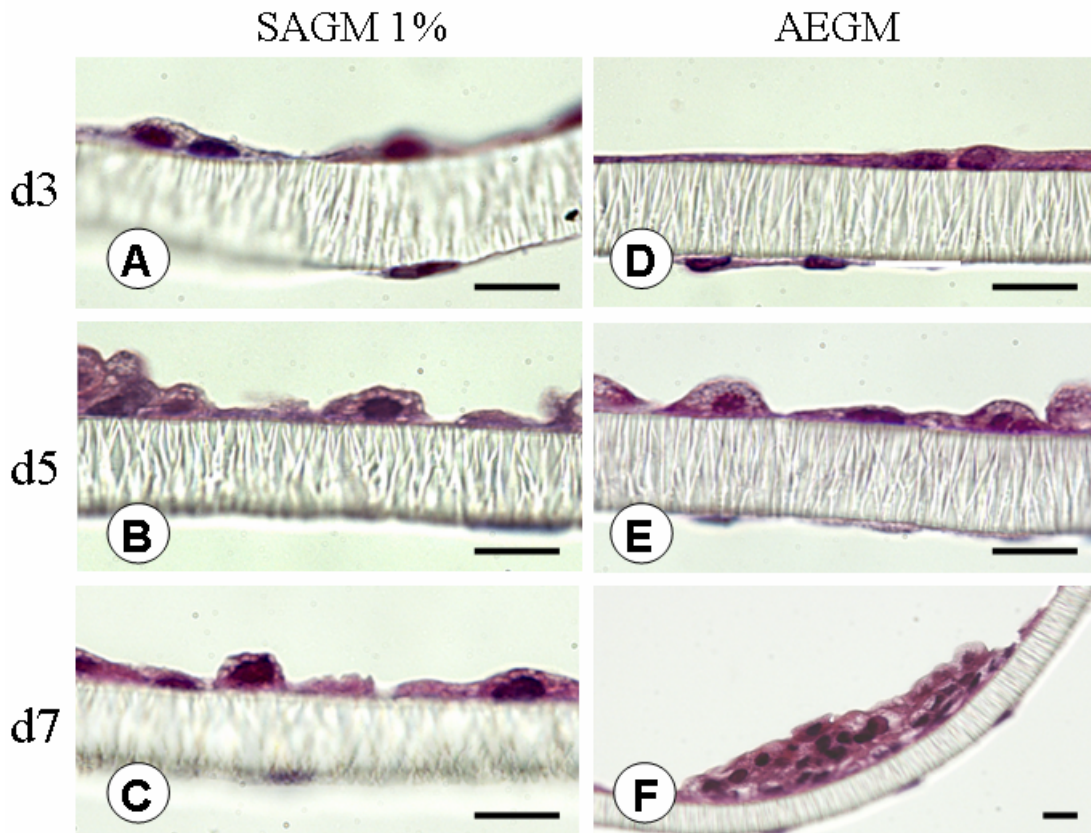


Abb. 77 Morphologischer Phänotyp von Primärkulturen hATII Zellen (P0) in Ko-Kultur mit HPMEC in kombinierten Medien. H/E-Färbung von Ko-Kulturen von hATII Zellen in P0 mit HPMEC (P3) auf beiden Seiten der Filtermembran in kombiniertem Medium SAGM 1% FKS/PC 15% FKS (o/u) an Tag 3 (A), Tag 5 (B) und Tag 7 (C) der Kultivierung bzw. in serumfreiem AEGM/PC 15% FKS (o/u) an Tag 3-7 (D-E). Lichtmikroskopie, Größenmarker=10 μ m. Während in SAGM 1% FKS/PC 15% FKS (o/u) ein kontaktinhibierter Monolayer von Epithelzellen nachweisbar war, bildeten sich ab Tag 7 der Bilayer-Ko-Kultur in AEGM/PC 15% FKS (o/u) vermehrt Areale mit zellulären Multilayern von Epithelzellen aus.

Wurden die hATII Zellen direkt nach der Isolation in P0 mit HPMEC ko-kultiviert, konnte ein kontaktinhibierter Monolayer beider Zelltypen in SAGM 1% FKS/PC 15% FKS (o/u) erhalten werden. Wurde statt SAGM 1% im oberen Well AEGM eingesetzt, waren bereits nach 7 Tagen in Ko-Kultur vermehrt Areale mit zellulären Multilayern auf der Filtermembran nachweisbar. Dieses Verhalten der Ko-Kulturen ähnelte den Befunden der Mono-Kulturen der hATII Zellen in P0 (siehe Kapitel 3.2.1). Während in SAGM 1% FKS ein gleichmäßiger kontaktinhibierter Monolayer etabliert wurde, fand man in AEGM vermehrt Areale stark proliferierender Zellen (siehe Kapitel 3.2.1).

Obwohl serumhaltiges Medium die Transdifferenzierung von hATII Zellen zu hATI-ähnlichen Zellen induzierte, waren am Tag 7 in SAGM 1 FKS/PC 15% FKS noch viele Epithelzellen mit eindeutiger kuboidaler Morphologie, ähnlich der von hATII Zellen, in Ko-Kultur nachweisbar

(Abb. 77C). Alle Alveolarepithelzellen waren bei einem immunzytochemische Nachweis am Tag 7 positiv für TTF-1 und SP-C, was den hATII-Ursprung der Zellen belegt (nicht gezeigt).

In serumfreiem AEGM/PC 15% FKS konnte auch in P0 kein Monolayer von Alveolarepithelzellen mit einem hATII-Phänotyp aufrechterhalten werden. Daher wurde als optimierte Kulturbedingung für die Ko-Kultur der Primärzellen die Kultivierung von hATII Zellen in P0 mit SAGM 1% FKS im oberen Well und HPMEC mit PC 15% FKS, bFGF/Heparin (2,5ng/10µg/ml) im unteren Well ausgewählt.

Unter den gewählten Bedingungen war eine Bilayer-Ko-Kultur von HPMEC mit Alveolarepithelzellen mit reinem hATII-Phänotyp nicht etablierbar. Die Ko-Kultur der Primärzellen mit SAGM 1% FKS im oberen Well und PC 15% FKS, bFGF/Heparin (2,5ng/10µg/ml) im unteren Well zeigte nach 10-13 Tagen auf epithelialer Seite deutlich alveolare Epithelzellen mit morphologischen Phänotypen von hATII Zellen bzw. hATI-ähnlichen Zellen (Abb. 78).

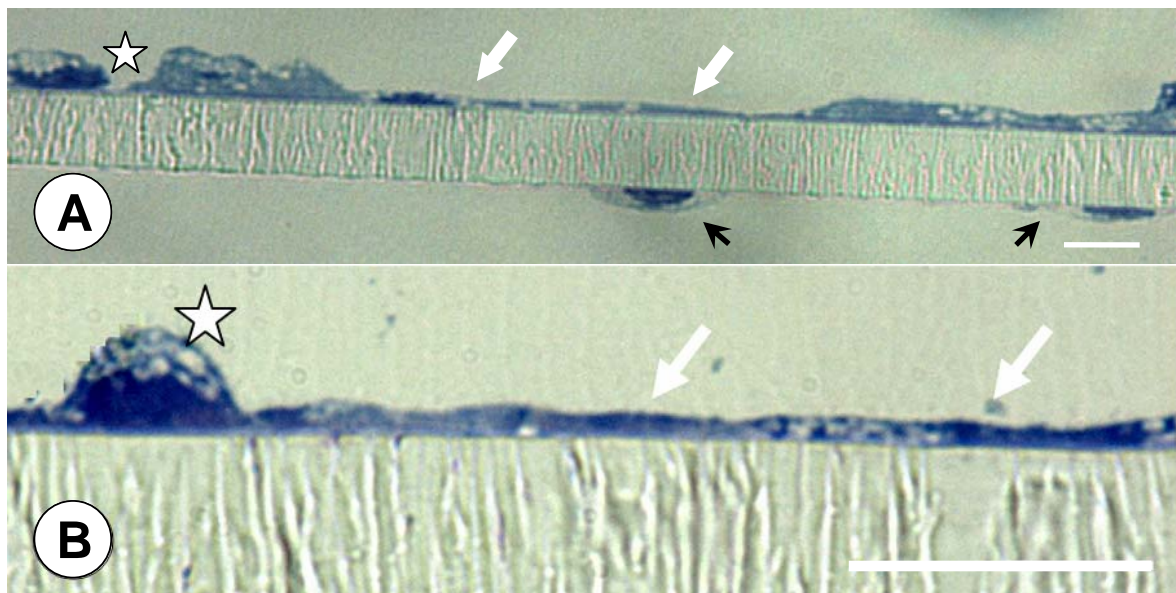


Abb. 78 Morphologische Phänotypen der hATII Zellen (P0) in Bilayer-Ko-Kultur mit HPMEC nach 13 Tagen. Semidünnschnitt der Bilayer-Ko-Kultur von humanen Alveolarepithelzellen in P0 (A und B, Oberseite der Filtermembran) mit HPMEC (A, Unterseite der Filtermembran, schwarze Pfeile) in kombiniertem Medium SAGM 1% FKS/PC 15% FKS (o/u) an Tag 13 der Kultivierung. In der Vergrößerung sind der morphologische Phänotyp einer kuboidalen hATII Zelle (A und B, Stern) und der morphologische Phänotyp von abgeflachten hATI-ähnlichen Zellen dargestellt (A und B, weisse Pfeile). Methylenblaufärbung bei lichtmikroskopischer Aufnahme. Größenmarker=10 µm

3.12 Funktionelle Untersuchung der etablierten Ko-Kulturen

Die Ursachen unterschiedlicher Verläufe inflammatorischer Vorgänge im Bereich der Alveolen sind nur unvollständig bekannt. Tierexperimentelle und klinische Studien haben in den letzten Jahren die Wichtigkeit der *early response* Zytokine und der Chemokine bei Patienten mit Sepsis und Acute Respiratory Distress Syndrom aufgezeigt. In der Frühphase des ARDS konnten signifikant erhöhte TNF- α und IL-1 β -Konzentrationen in der Bronchiallavage-Flüssigkeit von Patienten gemessen werden (Hyers et al., 1991). Unter anderem sind Zytokine an der Aktivierung des Kapillarendothels wie auch des Alveolarepithels beteiligt und spielen ebenfalls eine Rolle beim Funktionsausfall der Alveolarschranke (Bachofen und Weibel, 1977; Matthay, 1994).

In folgenden Studien wurden TNF- α und IFN- γ als exemplarische Zytokine eingesetzt, von denen eine Wirkung auf die Barrierefunktion und Aktivierung von Epithelzellen und Endothelzellen beschrieben ist. Mit deren Hilfe sollte die Funktionalität der im Ko-Kultur Modell etablierten Barriere und die Aktivierbarkeit der Zellen in Bilayer-Ko-Kultur überprüft werden.

3.12.1 Stimulation mit TNF- α

Außer einer Wirkung auf die Expression von Zelladhäsionsmolekülen (CAMs) und die Expression inflammatorischer Zytokine spielt TNF- α als Produkt aktivierter Alveolarmakrophagen bzw. aktivierter Monozyten bei einer Veränderung der endothelialen und epithelialen Barriere in Folge inflammatorischer Erkrankungen eine Rolle (van der Poll und Lowry, 1995; Rotundo et al., 2002).

In Mono-Kultur wurde durch Stimulation mit 300 U/ml TNF- α die Expression von CAMs bei den Endothelzellen ISO-HAS-1 und HPMEC hochreguliert und die Freisetzung weiterer Mediatoren, wie IL-6, IL-8, MCP-1 und RANTES induziert (siehe Kap. 3.6). NCI H441 ließen sich mit TNF- α im Hinblick auf eine Erhöhung der ICAM-1-Expression und eine Induktion der Expression von IL-8 und MCP-1 stimulieren (siehe Kap. 3.5). Daher wurde die Stimulation mit dem proinflammatorischen Zytokin TNF- α als Modellsubstanz für weitere Studien zum Einfluss von Zytokinen auf die Barriereeigenschaften des etablierten Ko-Kulturmodells von NCI H441 mit HPMEC oder ISO-HAS-1 eingesetzt.

3.12.1.1 TER-Werte nach Stimulation mit TNF- α

Um die Wirkung von TNF- α auf den TER zu untersuchen wurden Konzentrationen von 30 U/ml, 60 U/ml und 300 U/ml TNF- α eingesetzt. Dabei wurde die Ko-Kultur am Tag 10 von der endothelialen Seite (unteres Well, basolateral) bzw. von der epithelialen Seite (oberes Well, apikal) zunächst für 24 h in Medium mit 1 μ M Dexamethason stimuliert. Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel und es wurde entweder frisches Medium ohne Stimulanz oder das Stimulanz in gleicher Konzentration für weitere 24 h zugegeben. Die Messung der TER-Werte wurde 4, 8, 12, 24 und 48 h nach Stimulation durchgeführt. Um zeitlich auftretende Schwankungen der TER-Werte zu

normieren, werden die gemessenen TER-Werte zu jedem Zeitpunkt der Messung in Prozent der unstimulierten Kontrolle (w/o Stim) angegeben.

Wurde TNF- α in das untere Well der Bilayer-Ko-Kultur gegeben (Stimulation von basolateral, endotheliale Seite), konnte bereits nach 12-stündiger Stimulation der TER-Wert der Ko-Kultur durch 300 U/ml TNF- α deutlich reduziert werden (Abb. 79A, B). Die apikale Stimulation mit gleicher Konzentration an TNF- α zeigte keine signifikante Verringerung der TER-Werte (nicht gezeigt). Nach basolateraler Gabe von 300 U/ml TNF- α wurde der TER-Wert nach 24 h auf $70\pm 5\%$ der unbehandelten Kontrolle reduziert (Abb. 79A, B). Eine erneute 24-stündige Stimulation (insgesamt 48h Stimulation) mit TNF- α führte zu keiner weiteren Reduktion des TER (Abb. 79A). Nach basolateraler Stimulation mit 300 U/ml TNF- α für 24 h und anschließendem Mediumwechsel ohne Stimulanz für weitere 24 h konnte der TER-Wert mit $94\pm 13\%$ wieder auf das Niveau der unbehandelten Kontrolle angehoben werden (Abb. 79B, 24 h w/o).

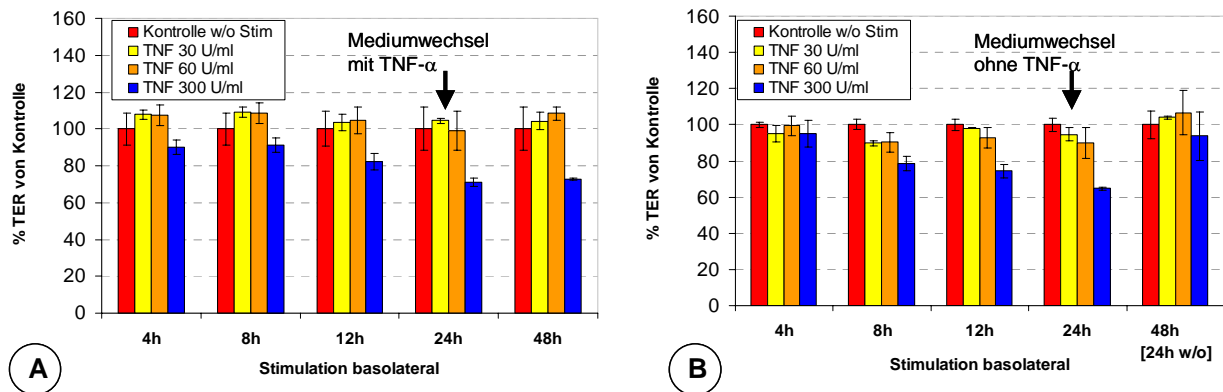


Abb. 79 Effekte einer basolateralen Stimulation mit TNF- α für 24 h bzw. 48 h auf die TER-Werte der Bilayer-Ko-Kulturen von NCI H441 und HPMEC. TER-Werte bei Ko-Kulturen von NCI H441 (P41) mit HPMEC (P5) in RP/MC (o/u) mit $1\ \mu\text{M}$ Dexamethason ohne Stimulanz und nach basolateraler Stimulation mit 30 U/ml, 150 U/ml und 300 U/ml TNF- α . Erneute Gabe von TNF- α nach 24-stündiger Inkubation (A) bzw. Zugabe von Medium ohne Stimulanz (B). Mittelwert \pm SD. ($n=4$, Vorkultur 10d). Bereits nach 12-stündiger Stimulation wurde der TER-Wert der Ko-Kultur deutlich reduziert. Nach 24 h mit 300 U/ml TNF- α betrug der TER-Wert $70\pm 5\%$ der unbehandelten Kontrolle. Durch anschließenden Mediumwechsel ohne Stimulanz wurde der TER-Wert innerhalb von 24 h wieder auf das Niveau der unbehandelten Kontrolle regeneriert.

3.12.1.2 Expression von Zell-Zell-Kontaktmolekülen nach Stimulation mit TNF- α

Die Ko-Kulturen von NCI H441 mit HPMEC wurden nach 48-stündiger Inkubation mit PFA fixiert und die Zell-Zell-Kontakte der Epithelzellen mit ZO-1 und E-Cadherin mittels Immunfluoreszenz markiert. Bei den mit TNF- α für insgesamt 48h basolateral stimulierten Ko-Kulturen zeigten NCI H441 eine konzentrationsabhängig erniedrigte Expression von E-Cadherin. Hier war E-Cadherin bei basolateraler Stimulation mit 300 U/ml TNF- α schwach (Abb. 80A), mit 60 U/ml fragmentiert (Abb. 80B) und mit 30 U/ml gleichmäßig an den Zellgrenzen (Abb. 80C) nachweisbar. Nach basolateraler Stimulation mit 60 und 300 U/ml TNF- α für 24 h und anschließendem Mediumwechsel

ohne Stimulanz für weitere 24 h war E-Cadherin wieder ähnlich stark wie bei 30 U/ml an den Zell-Zell-Grenzen benachbarter Epithelzellen lokalisiert (Abb. 80D, E). Im Unterschied zu einer Stimulation mit 30 U/ml (Abb. 80F) wurde E-Cadherin nach Stimulation mit 60 und 300 U/ml TNF- α bei den regenerierten NCI H441 (24 h Stimulation, 24 h Medium ohne Stimulanz) nicht gleichmäßig bandförmig entlang der Zell-Zell-Grenzen sondern eher punktiert exprimiert (Abb. 80D, E).

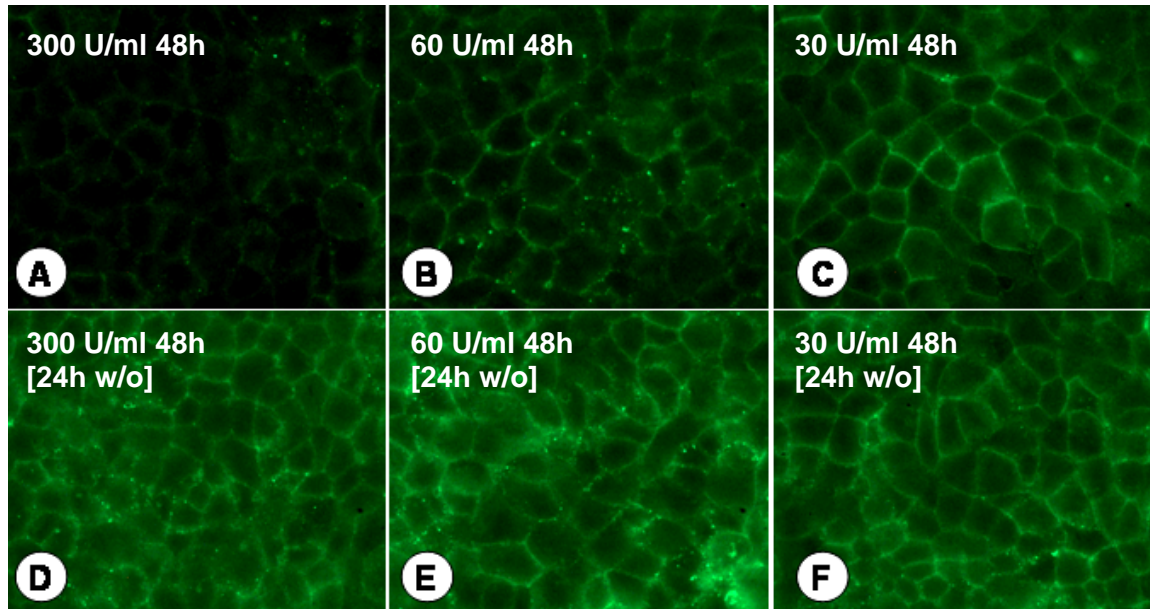


Abb. 80 Effekte einer basolateralen Stimulation mit TNF- α (300 U/ml, 60 U/ml, 30 U/ml) auf die Expression von E-Cadherin bei NCI H441 in Bilayer-Ko-Kultur mit HPMEC. Immunfluoreszenz-Markierung von E-Cadherin (grün) bei NCI H441(P41) in Ko-Kultur mit HPMEC (P5). Basolaterale Stimulation mit 300 U/ml (A), 60 U/ml (B) und 30 U/ml (C) TNF- α für 48 h bzw. für Stimulation 24 h mit 300 U/ml (D), 60 U/ml (E) und 30 U/ml (F) TNF- α und anschließenden Mediumwechsel ohne Stimulanz für weitere 24 h (24h w/o). Vergrößerung 400x. Bei Stimulation mit 30 U/ml TNF- α wurde E-Cadherin gleichmäßig entlang der Zell-Zell-Grenzen exprimiert. Bei 300 U/ml (A) und 60 U/ml (B) zeigten NCI H441 eine konzentrationsabhängig erniedrigte Expression von E-Cadherin nach 48-stündiger Stimulation. Durch Wegnahme von 300 U/ml bzw. 60 U/ml TNF- α nach wurde die Expressin von E-Cadherin nach weiteren wieder hergestellt (24 h Stimulation, 24 h Medium ohne Stimulanz). Dabei wurde E-Cadherin nicht gleichmäßig bandförmig entlang der Zell-Zell-Grenzen sondern eher punktiert exprimiert (D und E).

Bei apikaler Stimulation mit 30, 60 und 300 U/ml TNF- α war die Expression von E-Cadherin nicht verändert. Für die Expression von ZO-1 konnte weder nach basolateraler noch nach apikaler Stimulation mit 30 U/ml, 60 U/ml und 300 U/ml TNF- α eine Veränderungen festgestellt werden (nicht gezeigt).

3.12.1.3 Parazellulärer Transport von Natrium-Fluoreszein nach Stimulation mit TNF- α

Die Reduktion des TER-Wertes nach basolateraler Stimulation mit 300 U/ml TNF- α hatte nach 48-stündiger Stimulation einen leichten, jedoch nicht signifikanten Einfluss auf den Permeabilitätskoeffizienten der Bilayer Ko-Kultur. Durch eine apikale Gabe der 5fachen Menge an TNF- α ließ sich jedoch der Permeabilitätskoeffizient deutlich gegenüber der unstimulierten Kontrolle erhöhen (Tab. 17).

Tab. 17: Permeabilitätskoeffizienten (P_{app} -Werte) für den Transport von Natrium-Fluoreszein durch Bilayer-Ko-Kulturen von NCI H441 mit HPMEC in RP/MC + 1 μ M Dexamethason. Stimulation mit TNF- α für 48h. Mittelwert \pm SD (n= 3).

Lösung	P_{app} (x 10 ⁻⁶ cm/sec) nach 48h				
	unstimuliert	60 U/ml TNF- α (basolateral)	300 U/ml TNF- α (basolateral)	300 U/ml TNF- α (apikal)	1500 U/ml TNF- α (apikal)
Natrium-Fluoreszein	0,70 \pm 0,04	0,65 \pm 0,20	0,87 \pm 0,27	0,65 \pm 0,29	1,14 \pm 0,04

3.12.2 Stimulation der Ko-Kultur mit TNF- α und IFN- γ

Bei Untersuchung der Bilayer-Ko-Kulturen von NCI H441 und HPMEC zeigte die basolaterale Stimulation mit TNF- α eine reduzierende Wirkung auf die TER-Werte, die reversibel war. Für das von T-Lymphozyten nach Stimulation freigesetzte Zytokin IFN- γ ist ebenfalls eine Wirkung auf die Permeabilität der *Tight Junctions* bei bronchiale Epithelzellen bekannt (Adams et al., 1993; Ahdieh et al., 2001; Coyne et al., 2002). IFN- γ diente somit neben TNF- α als weiteres Modellzytokin mit bekannter Wirkung auf die Barrierefunktion und die Aktivierung von Zelladhäsionsmolekülen sowie die sekundäre Freisetzung weiterer Zytokine durch die Zielzellen.

TNF- α wurde in der im vorangegangenen Kapitel ermittelten Konzentration von 300 U/ml sowie IFN- γ in einer Konzentration von 2000 U/ml zur apikalen und basolateralen Stimulation der Ko-Kulturen von NCI H441 mit HPMEC bzw. NCI H441 mit ISO-HAS-1 eingesetzt. Die Kombination beider Zytokine, die einen ko-stimulatorischen Effekt auslösen sollte, wurde ebenfalls untersucht. Neben dem Einfluss auf die TER-Werte der Ko-Kulturen wurde die Freisetzung löslicher Formen von ICAM-1 und VCAM-1 sowie die Freisetzung der Zytokine IL-6, IL-8, MCP-1 und RANTES in das obere (epitheliale Seite) und das untere Well (endotheliale Seite) der Ko-Kultur gemessen.

3.12.2.1 TER-Werte nach Stimulation der Ko-Kultur mit TNF- α und IFN- γ

Die Bilayer-Ko-Kultur von NCI H441 mit HPMEC bzw. ISO-HAS-1 wurde am Tag 10 von der endothelialen Seite (unteres Well, basolateral) bzw. von der epithelialen Seite (oberes Well, apikal) zunächst für 24 h in Medium mit 1 μ M Dexamethason und TNF- α (300 U/ml) bzw. IFN- γ (2000 U/ml) bzw. TNF- α (300 U/ml) + IFN- γ (2000 U/ml) stimuliert. Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel und es wurde entweder frisches Medium ohne Stimulanzen oder die Stimulanzen in gleicher Konzentration für weitere 24 h zugegeben. Die Messung der TER-Werte wurde 4, 12, 24, 36 und 48 h nach Stimulation durchgeführt.

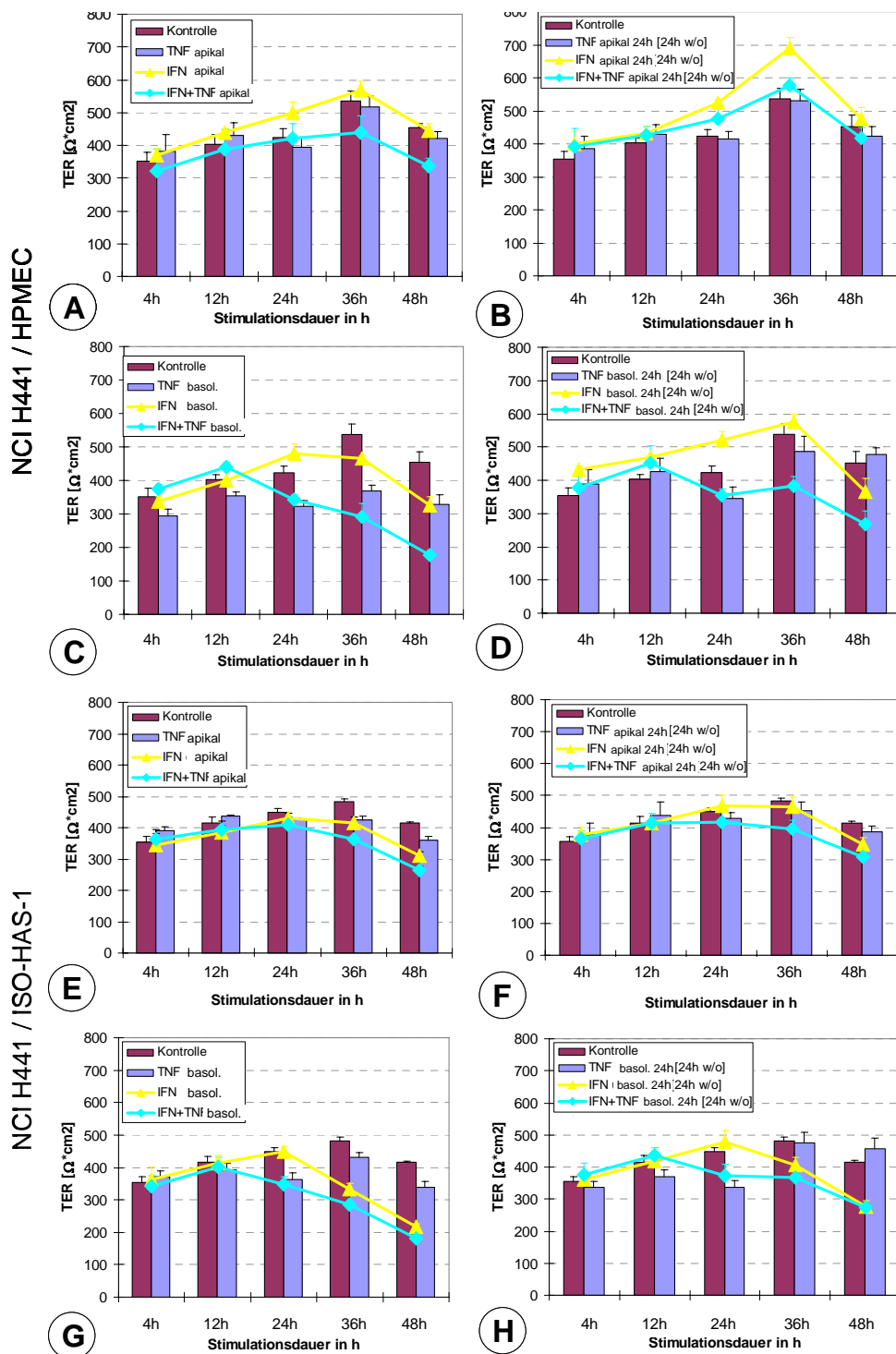


Abb. 81 Effekte einer Stimulation mit TNF- α und IFN- γ für 24 h bzw. 48 h auf die TER-Werte der Bilayer-Ko-Kulturen von NCI H441 und HPMEC bzw. ISO-HAS-1. NCI H441 und HPMEC (P4) (A-D) bzw. NCI H441 und ISO-HAS-1 (E-G) in RP/MC (o/u) mit 1 μM Dexamethason ohne Stimulanz (■) und nach apikaler (A, B, E, F) und basolateraler (C, D, G, H) Stimulation mit 300 U/ml TNF- α (■) bzw. 2000 U/ml IFN- γ (▲) oder beiden Zytokinen (◆). Erneute Stimulation nach 24-stündiger Inkubation (links) bzw. Zugabe von Medium ohne Stimulanz (rechts 24 h [24 h w/o]). Mittelwert \pm SD (n=3). Apikal zugegeben verursachte TNF- α keine Erniedrigung des TER-Wertes. Beide Bilayer-Ko-Kulturen reagierten auf apikale Gabe von TNF- α + IFN- γ nach 48h mit einer Erniedrigung der TER-Werte um 23-25% gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Basolateral zugegeben wurden die TER-Werte durch TNF- α + IFN- γ um ca. 50% nach 48h erniedrigt. Die TER-Werte konnten durch Wegnahme von TNF- α + IFN- γ nicht wieder hergestellt werden.

Die apikale Gabe von TNF- α alleine löste weder bei Ko-Kulturen von NCI H441 mit HPMEC (Abb. 81A) noch von NCI H441 mit ISO-HAS-1 (Abb. 81E) eine Erniedrigung der TER-Werte aus. IFN- γ verursachte apikal eine unterschiedliche Reaktion bei den verschiedenen Ko-Kulturen. Während die TER-Werte bei NCI H441/HPMEC nicht verändert waren (Abb. 81A), reagierten NCI H441/ISO-HAS-1 mit einer Erniedrigung um 22% nach 48h (Abb. 81E). Die Kombination von 300 U/ml TNF- α und 2000 U/ml IFN- γ , apikal zugegeben, löste bei beiden Ko-Kulturen (NCI H441/HPMEC und NCI H441/ISO-HAS-1) nach 48-stündiger Inkubation gegenüber der unbehandelten Kontrolle deutliche um ca. 23-25% reduzierte TER-Werte aus (Abb. 81A, E).

Die basolaterale Stimulation mit 300 U/ml TNF- α verursachte, wie im vorangegangenen Kapitel bereits beschrieben, nach 24 h eine Reduktion der TER-Werte auf $70\pm 5\%$ der unbehandelten Kontrolle (Abb. 81C). Diese konnte sowohl bei NCI H441/HPMEC (Abb. 81D), als auch bei NCI H441/ISO-HAS-1 (Abb. 81H), nach weiterem 24 h in Medium ohne Stimulanz wieder auf Kontrollniveau angehoben werden. Basolateral zugegeben lösten IFN- γ alleine und IFN- γ + TNF- α bei beiden Ko-Kulturen reduzierte TER-Werte aus, die durch einen Mediumwechsel nach weiteren 24 h leicht erhöht werden konnten, das Niveau der unbehandelten Kontrolle wurde jedoch nicht mehr erreicht (Abb. 81C und D bzw. 92 G und H). Dabei reagierten die Ko-Kulturen von NCI H441 mit HPMEC weniger sensitiv auf die basolaterale Gabe von IFN- γ als NCI H441 mit ISO-HAS-1 (Abb. 81C und G).

3.12.2.2 Parazellulärer Transport von Natrium-Fluoreszein bei Stimulation mit TNF- α und IFN- γ

48 h nach Stimulation mit 300 U/ml TNF- α bzw. 2000 U/ml IFN- γ und beiden Stimulanzien in Kombination wurde analog der Erniedrigung des TER-Werts der Transport von Natrium-Fluoreszein untersucht. Anders als bei den Transportexperimenten zuvor wurde der Transport in serumhaltigem Ko-Kulturmedium durchgeführt. Da die Ko-Kulturen bereits durch die Stimulation aktiviert waren, sollte eine zusätzliche Beeinflussung der Zellen durch den serumfreien Krebs-Ringer-Puffer vermieden werden.

Den stärksten Effekt auf den Permeabilitätskoeffizienten (P_{app}) der Bilayer-Ko-Kultur nach 48-stündiger Stimulation hatte die basolaterale Gabe von TNF- α + IFN- γ . Hier lag der P_{app} bei NCI H441/HPMEC mit $0,557\pm 0,021\times 10^{-6}$ cm/sec um 3fach höher als der P_{app} der unstimulierten Kontrolle mit $0,169\pm 0,015\times 10^{-6}$ cm/sec. Die Ko-Kultur von NCI H441/ISO-HAS-1 lieferte vergleichbare Werte (Abb. 82). Nach basolateraler Stimulation mit TNF- α war der P_{app} bei NCI H441/HPMEC mit $0,247\pm 0,026\times 10^{-6}$ cm/sec gegenüber der unstimulierten Kontrolle ca. 1,5fach erhöht. Während nach 24-stündiger Stimulation und anschließender nach 24-stündiger Inkubation in Medium ohne Stimulanz der P_{app} mit $0,176\pm 0,025\times 10^{-6}$ cm/sec wieder auf Kontrollniveau lag. Bei Ko-Kulturen mit HPMEC wurde nach basolateraler Stimulation durch die folgende 24-stündige Inkubation in Medium ohne Stimulanz der Permeabilitätskoeffizient deutlicher reduziert als bei Ko-Kulturen mit ISO-HAS-1 (Abb. 82)

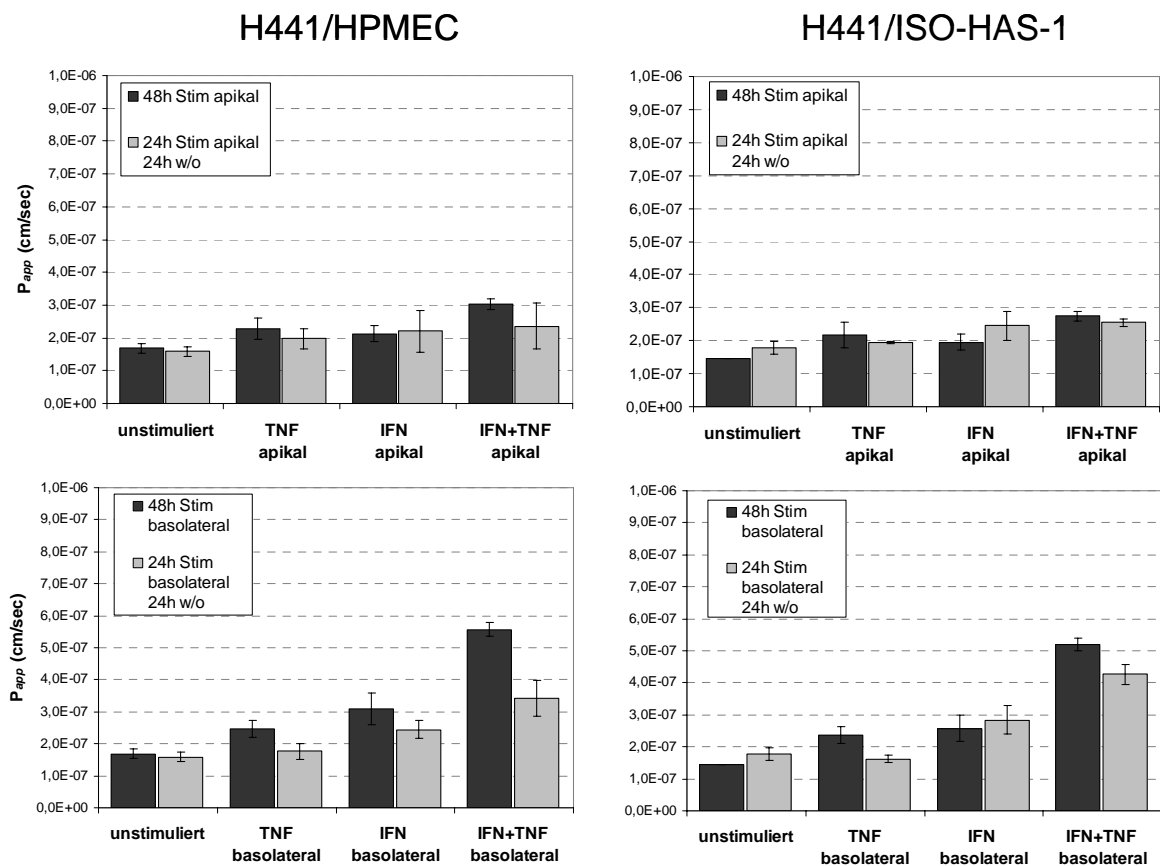


Abb. 82 Permeabilitätskoeffizienten (P_{app} -Werte) für den Transport von Natrium-Fluoreszein durch Bilayer-Ko-Kulturen von NCI H441 mit HPMEC bzw. ISO-HAS-1 nach Stimulation. P_{app} -Werte für den Transport von Natrium-Fluoreszein durch Bilayer-Ko-Kulturen von NCI H441 mit HPMEC (links) bzw. mit ISO-HAS-1 (rechts) in RP/MC + 1 μ M Dexamethason. Stimulation mit 300 U/ml TNF- α bzw. 2000 U/ml IFN- γ oder beiden Zytokinen von der apikalen Seite (oberes Well) oder der basolateralen Seite (unteres Well). Erneute Stimulation nach 24-stündiger Inkubation (dunkle Balken) bzw. Zugabe von Medium ohne Stimulanz (helle Balken 24 h, 24 h w/o). Mittelwert \pm SD ($n=3$). Apikal verursachten TNF- α und IFN- γ alleine keine signifikante Erhöhung des Permeabilitätskoeffizienten (P_{app}). Beide Bilayer-Ko-Kulturen reagierten auf die 48-stündige apikale Gabe von TNF- α + IFN- γ mit einer gegenüber der unbehandelten Kontrolle 1,7-1,8fachen Erhöhung des P_{app} . Basolateral zugegeben wurde der P_{app} durch TNF- α signifikant um 1,5fach gegenüber der unstimulierten Kontrolle erhöht. Durch Wegnahme von TNF- α nach 24 h konnte der P_{app} der unstimulierten Kontrolle nach weiteren 24 h wieder hergestellt werden. Die 1,6-1,8fache Erhöhung des P_{app} durch basolaterale Gabe von IFN- γ war nicht reversibel. Nach 48-stündiger Stimulation hatte die basolaterale Gabe von TNF- α + IFN- γ den größten Effekt auf den Permeabilitätskoeffizienten beider Bilayer Ko-Kulturen. Der P_{app} nach basolateraler Gabe von TNF- α + IFN- γ für 48 h war um ca. 3fach höher als der P_{app} der unstimulierten Kontrolle. Wie für IFN- γ konnte auch nach basolateraler Gabe von TNF- α + IFN- γ für 24 h und Zugabe von Medium ohne Stimulanz für weitere 24 h der P_{app} der unstimulierten Kontrolle innerhalb von 24 h nicht wieder hergestellt werden.

3.12.2.3 Expression von Zelladhäsionsmolekülen (Cell Adhesion Molecules, CAMs)

Da Zelladhäsionsmolekül-EIAs technisch an den Bilayer-Ko-Kulturen nicht durchführbar waren, wurde die Expression der Adhäsionsmoleküle (CAMs) nach 24-stündiger Stimulation über die löslichen Formen sICAM-1 und sVCAM-1 bestimmt. Die Freisetzung der löslichen Adhäsionsmoleküle sICAM-1 und sVCAM-1 korrelierte mit deren Oberflächenexpression, wie bereits in Vorversuchen an Mono-Kulturen von NCI H441 und HPMEC gezeigt wurde. Untersucht wurde eine Stimulation mit TNF- α (300 U/ml) und IFN- γ (2000 U/ml) und die Kombination beider Zytokine, die einen ko-stimulatorischen Effekt auslösen sollte.

Bei Erreichen eines stabilen TER-Wertes, meist Tag 10 der Ko-Kultivierung, wurden die Ko-Kulturen für 24 h entweder von der epithelialen Seite (oberes Well, apikal) oder von der endothelialen Seite (unteres Well, basolateral) mit Zytokinen stimuliert (siehe Schema Abb. 83). Anschließend wurden die Mediumüberstände der oberen (apikalen) und unteren (basolateralen) Wells getrennt gesammelt und in Dreifachbestimmung mittels ELISA die Konzentration von sICAM-1 und sVCAM-1 gemessen. Die Bezeichnung apikal und basolateral richtet sich nach der apikalen und basolateralen Seite der Bilayer-Ko-Kultur und somit nach der Epithelzellschicht, da in diesem Bilayer-Modell der parazelluläre Stofftransport im Wesentlichen durch die epitheliale Barriere bestimmt wird.

Um die Konzentration der löslichen CAMs oder Zytokine im Mediumüberstand auf die Zellzahl zu beziehen, wurde diese in pg/cm^2 angegeben. Diese Einheit bezieht sich auf die absolute Menge der Substanz (CAM oder Zytokin) im Mediumüberstand in pg pro cm^2 konfluenter Zellrasen.

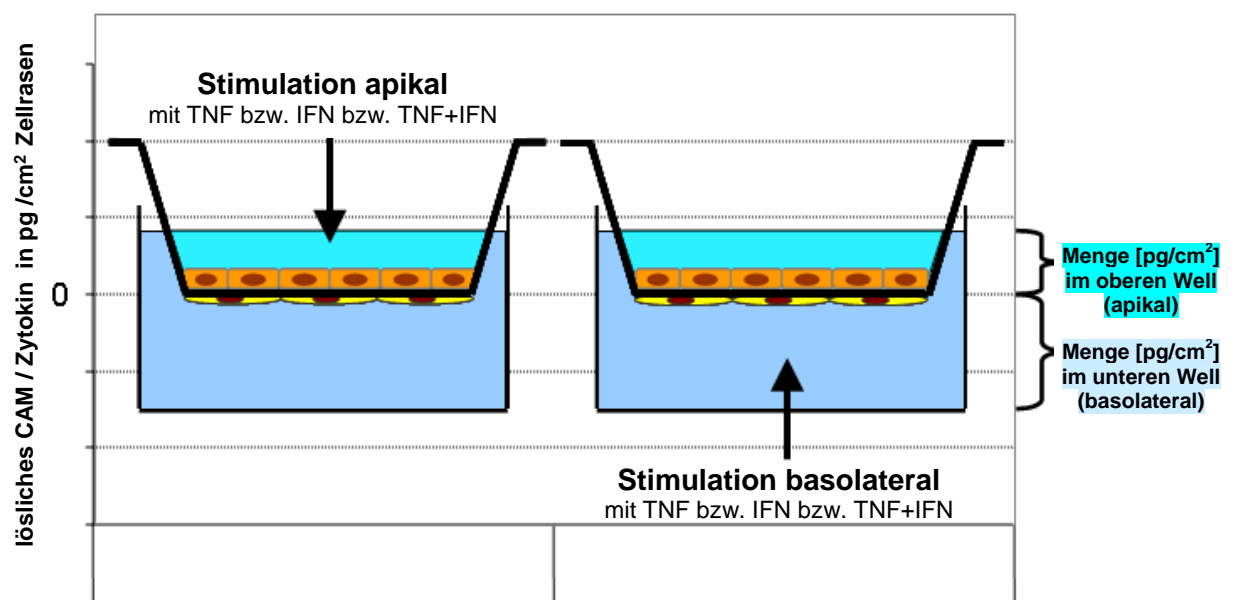


Abb. 83 Struktur der folgenden Abbildungen, mit denen die freigesetzten löslichen Adhäsionsmoleküle bzw. Zytokine für Bilayer-Ko-Kulturen auf Transwell-Filtern dargestellt werden. Die Ko-Kulturen wurden entweder apikal (epitheliale Seite, linker Transwell) oder basolateral (endotheliale Seite, rechter Transwell) mit TNF- α (300 U/ml) bzw. IFN- γ (2000 U/ml) bzw. TNF- α (300 U/ml) + IFN- γ (2000 U/ml) stimuliert. Die Freisetzung der löslichen CAMs bzw. Zytokine in das apikale Medium wird für das jeweilige Stimulanz als Histogrammsäule oberhalb des Nullwertes dargestellt, die Freisetzung in das basolaterale Medium entsprechend als Histogrammsäule unterhalb des Nullwertes.

Die Konzentration löslicher CAMs bzw. Zytokine im Mediumüberstand wird üblicherweise mit dem Begriff Freisetzung (*release*) gleichgesetzt. Eine Konzentrationsänderung der freigesetzten Proteine, die durch proteolytischen Abbau hervorgerufen werden könnte, wird dabei vernachlässigt. Wurde die Freisetzung von löslichen CAMs oder Zytokinen nach Stimulation auf der gleichen Seite gemessen wird der Begriff *ipsilateral* verwendet, wurden diese auf der der Stimulationsseite gegenüber liegenden Seite gemessen wird analog von einer *contralateralen* Freisetzung gesprochen.

Wurde von der epithelialen Seite (apikal) mit TNF- α bzw. IFN- γ oder TNF- α + IFN- γ stimuliert, so war *contralateral* weder die Freisetzung von sICAM-1 (Abb. 84, linker Transwell) noch die Freisetzung von sVCAM-1 (Abb. 85, linker Transwell) im Vergleich zur Kontrolle erhöht. Nach Zugabe der Zytokine von endothelialer Seite (basolateral) wurde durch TNF- α und verstärkt durch die Kombination beider Zytokine (TNF- α + IFN- γ) die *ipsilaterale* Freisetzung von sICAM-1 (Abb. 84, rechter Transwell) und sVCAM-1 (Abb. 85, rechter Transwell) aktiviert. Innerhalb von 24 h konnte IFN- γ (2000 U/ml) alleine weder die Freisetzung von sICAM-1 noch von sVCAM-1 im Vergleich zur Kontrolle erhöhen.

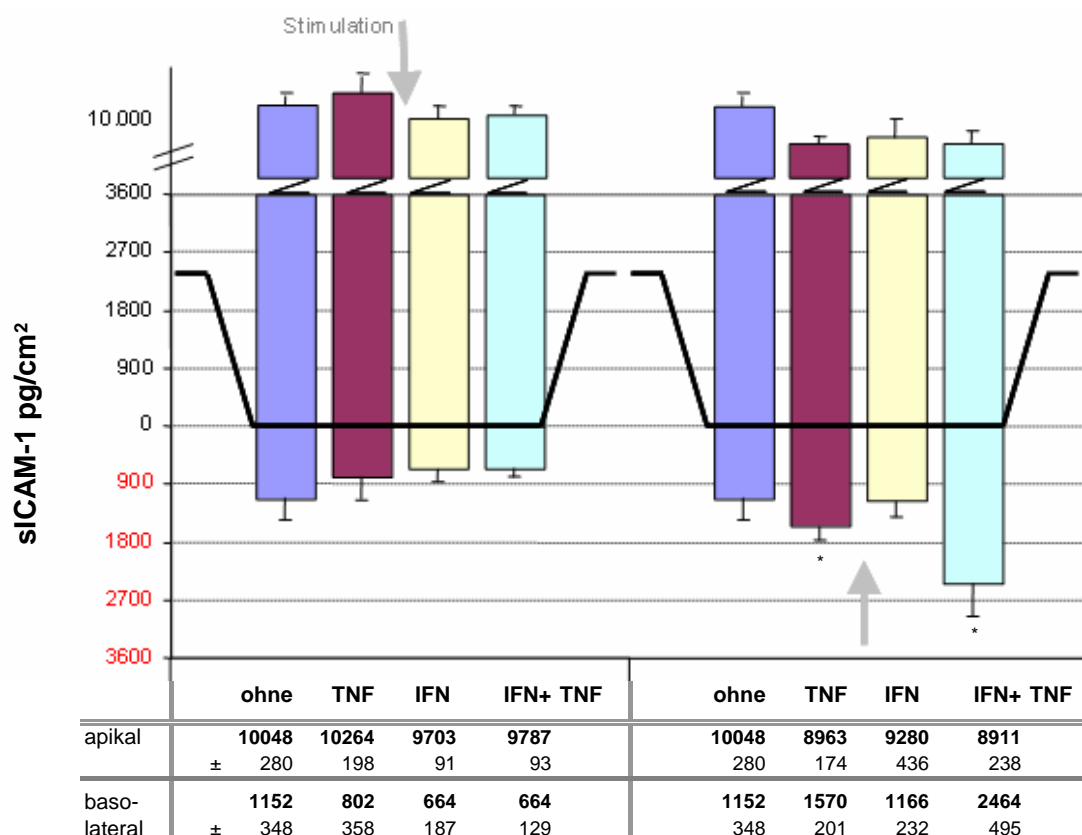


Abb. 84 Freisetzung von sICAM-1 bei der *Bilayer-Ko-Kultur* von NCI H441 mit HPMEC nach Stimulation mit TNF- α und IFN- γ . Apikale und basolaterale Freisetzung von sICAM-1 bei der Ko-Kultur von NCI H441 (P21) mit HPMEC (P4) in Ko-Kulturmedium mit Dexamethason nach 24-stündiger Inkubation ohne Stimulanz bzw. nach apikaler (linker Transwell) oder basolateraler (rechter Transwell) Stimulation mit TNF- α (300 U/ml), IFN- γ (2000 U/ml) sowie TNF- α (300 U/ml) + IFN- γ (2000 U/ml). Mittelwert \pm SD. $n=3$ (Vorkultur 10d). Die basolaterale Zugabe von TNF- α und ko-stimulatorisch von TNF- α + IFN- γ erhöht die ipsilaterale Freisetzung von sICAM-1.

Die nach apikaler Stimulation mit TNF- α für 24 h auf der epithelialen Seite (*ipsilateral*) gemessenen Menge von sICAM-1 war im Vergleich zur Kontrolle leicht aber nicht signifikant erhöht (Abb. 84, linker Transwell). Bei basolateraler Stimulation war sICAM-1 im *contralateralen* Well (auf epithelialer Seite) eher gegenüber der Kontrolle erniedrigt (Abb. 84, rechter Transwell).

Nach basolateraler Stimulation der Bilayer-Ko-Kultur mit TNF- α und TNF- α + IFN- γ für 24 h wurde die Freisetzung von sICAM-1 auf der endothelialen Seite gegenüber der unstimulierten Kontrolle signifikant erhöht. Nach basolateraler Stimulation der Bilayer-Ko-Kultur mit TNF- α lag die *ipsilaterale* Freisetzung von sICAM-1 (Abb. 84, rechter Transwell) in ähnlicher Größenordnung wie die Freisetzung von sICAM-1 bei HPMEC in Mono-Kultur [1570 \pm 200 pg/cm² sICAM-1 in Ko-Kultur bzw. 1998 \pm 72 pg/cm² in Mono-Kultur (Abb. 53 rechts, S. 111)]. Die nach basolateraler Stimulation der Bilayer-Ko-Kultur mit TNF- α *ipsilateral* vorhandene Menge an sVCAM-1 (Abb. 85, rechter Transwell) war niedriger als die von HPMEC in Mono-Kultur freigesetzte Menge an sVCAM-1 [525 \pm 47 pg/cm² sVCAM-1 in Ko-Kultur bzw. 1518 \pm 209 pg/cm² in Mono-Kultur (Abb. 53 links, S. 111)], lag aber im Rahmen individueller Spendervarianzen.

Weder nach apikaler noch nach basolateraler Stimulation konnte sVCAM-1 auf epithelialer Seite (oberes Well) nachgewiesen werden (Abb. 85). Die zelluläre Barriere schien trotz abfallender TER-Werte nach Stimulation mit TNF- α oder der Kombination von TNF- α + IFN- γ noch soweit intakt, dass kein von den HPMEC freigesetztes sVCAM-1 ins obere Well gelangte.

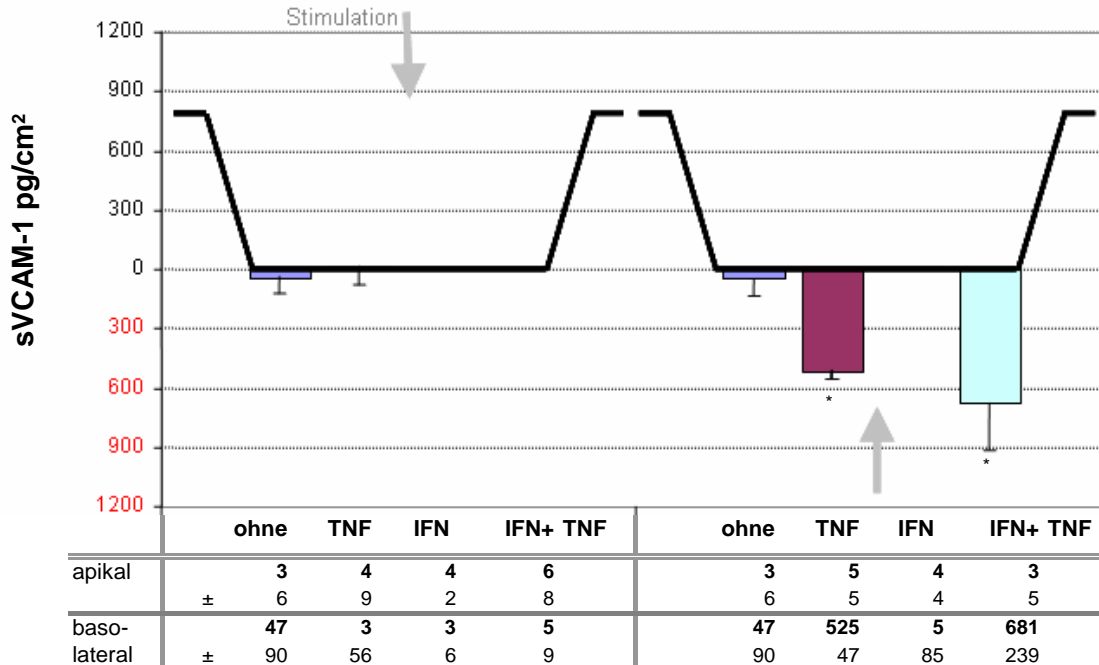


Abb. 85 Freisetzung von sVCAM-1 bei der Bilayer-Ko-Kultur von NCI H441 mit HPMEC nach Stimulation mit TNF- α und IFN- γ . Apikale und basolaterale Freisetzung von sVCAM-1 bei der Ko-Kultur von NCI H441 (P21) mit HPMEC (P4) in Ko-Kulturmedium mit Dexamethason nach 24-stündiger Inkubation ohne Stimulanz bzw. nach apikaler (linker Transwell) oder basolateraler (rechter Transwell) Stimulation mit TNF- α (300 U/ml), IFN- γ (2000 U/ml) sowie TNF- α (300 U/ml) + IFN- γ (2000 U/ml). Mittelwert \pm SD. n=3 (Vorkultur 10d). sVCAM-1 wird von HPMEC nach basolateraler Zugabe von TNF- α und kostimulatorisch von TNF- α + IFN- γ ipsilateral freigesetzt.

3.12.2.4 Freisetzung sekundärer inflammatorischer Mediatoren

Zusätzlich zur Bestimmung der löslichen Formen der CAMs wurden die Mediumüberstände auf die Freisetzung der Zytokine IL-6, IL-8, MCP-1 und RANTES hin untersucht. Ähnlich wie für die CAMs erfolgte die Analyse der von der epithelialen Seite (apikal) bzw. von der endothelialen Seite (basolateral) stimulierten Bilayer-Ko-Kulturen per Dreifachbestimmung mittels ELISA.

Die Basisexpression von IL-6 auf epithelialer Seite (apikal) wurde weder durch 24-stündige apikale noch durch basolaterale Stimulation mit TNF- α oder TNF- α + IFN- γ gesteigert (Abb. 86). Nach basolateraler Stimulation mit TNF- α und TNF- α + IFN- γ wurde IL-6 *ipsilateral* erhöht freigesetzt, *contralateral* wurde keine gegenüber der unstimulierten Kontrolle erhöhte Freisetzung gemessen (Abb. 86, rechter Transwell). Nach basolateraler Stimulation der Bilayer-Ko-Kultur mit TNF- α lag die *ipsilaterale* Freisetzung von IL-6 (Abb. 86, rechter Transwell) in ähnlicher Größenordnung wie die Freisetzung von IL-6 bei HPMEC in Mono-Kultur [416 \pm 28 pg /cm² IL-6 in Ko-Kultur bzw. 550 \pm 35 pg/cm² in Mono-Kultur (Abb. 54, S. 113)].

Für IL-8 wurde sowohl eine *ipsilaterale* als auch eine *contralaterale* Freisetzung gemessen. So wurde nach apikaler Stimulation mit TNF- α + IFN- γ , zusätzlich zur erhöhten Freisetzung von IL-8 auf epithelialer Seite (apikal), eine signifikante Erhöhung von IL-8 im unteren Well (basolateral) gemessen (Abb. 87, linker Transwell). Entsprechend war nach basolateraler Gabe von TNF- α und TNF- α + IFN- γ , zusätzlich zur erhöhten Freisetzung von IL-8 auf endothelialer Seite (basolateral), IL-8 im oberen Well (apikal) signifikant erhöht (Abb. 87, rechter Transwell). Dabei war die *contralaterale* Menge an IL-8 nach basolateraler Stimulation (Abb. 87, rechter Transwell) 15-20% niedriger als die nach apikaler Stimulation ins obere Well (*ipsilateral*) sezernierte Menge (Abb. 87, linker Transwell). IL-8 könnte sowohl von den Endothelzellen *contralateral* ins obere Well abgegeben worden sein, oder aber die Epithelzellen wurden von deren basolateralen Seite zur apikalen Freisetzung von IL-8 stimuliert.

Nach basolateraler Stimulation der Bilayer-Ko-Kultur mit TNF- α lag die *ipsilaterale* Freisetzung von IL-8 (Abb. 87, rechter Transwell) in ähnlicher Größenordnung wie die Freisetzung von IL-8 bei HPMEC in Mono-Kultur [9632 \pm 2020 pg/cm² IL-8 in Ko-Kultur bzw. 10959 \pm 590 pg/cm² in Mono-Kultur (Abb. 55, S. 113)]. Auch die nach apikaler Zugabe von TNF- α *ipsilateral* gemessenen Werte von IL-8 entsprachen in etwa den für Dexamethason-behandelte NCI H441 in Mono-Kultur ermittelten Werten [462 \pm 7 pg/cm² IL-8 in Ko-Kultur bzw. 635 \pm 12 pg/cm² in Mono-Kultur (Abb. 48, S. 106)].

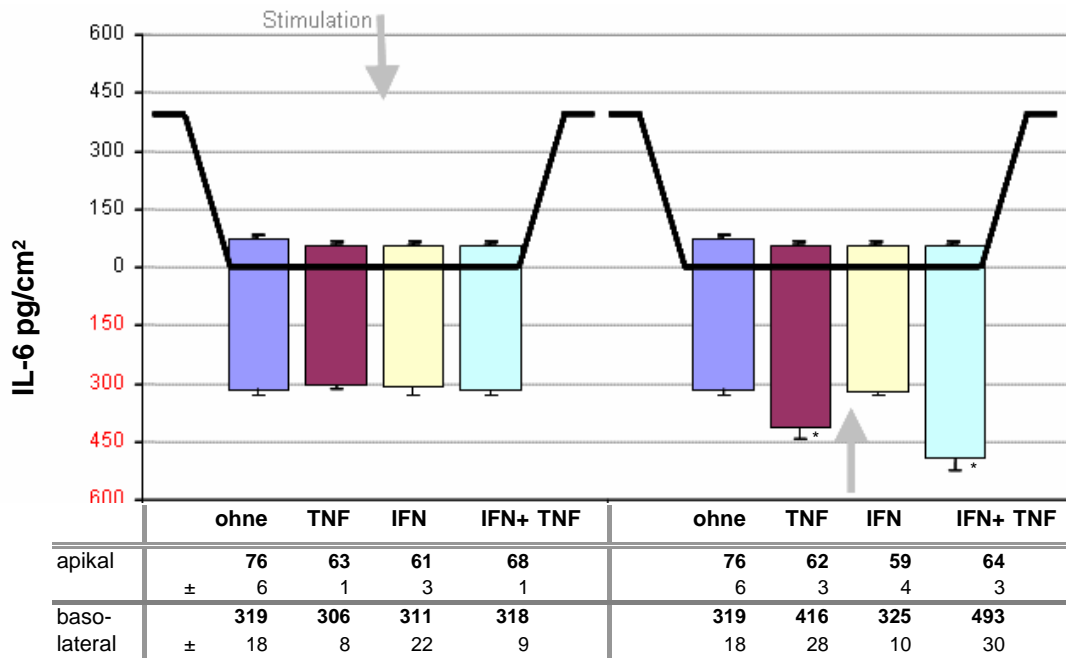


Abb. 86 Freisetzung von IL-6 bei der Bilayer-Ko-Kultur von NCI H441 mit HPMEC nach Stimulation mit TNF- α und IFN- γ . Apikale und basolaterale Freisetzung von IL-6 bei Ko-Kultur von NCI H441 (P21) mit HPMEC (P4) in Ko-Kulturmedium mit Dexamethason nach 24-stündiger Inkubation ohne Stimulanz bzw. nach apikaler (linker Transwell) oder basolateraler (rechter Transwell) Stimulation mit TNF- α (300 U/ml), IFN- γ (2000 U/ml) sowie TNF- α (300 U/ml) + IFN- γ (2000 U/ml). Mittelwert \pm SD. n=3 (Vorkultur 10d). IL-6 wird nach basolateraler Zugabe von TNF- α und von TNF- α + IFN- γ ipsilateral erhöht freigesetzt.

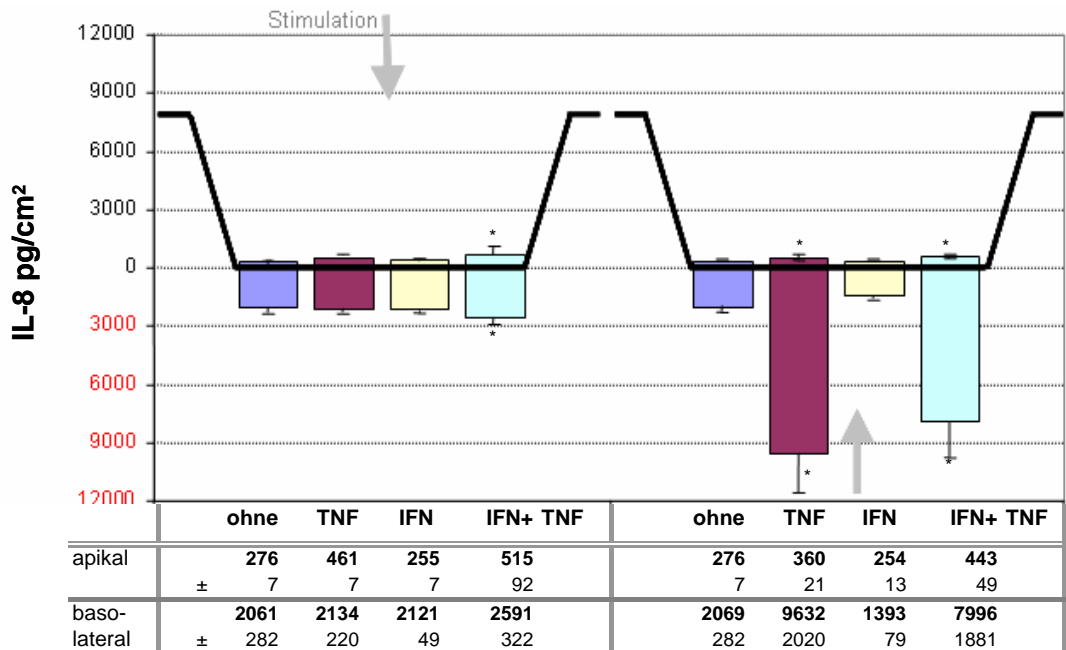


Abb. 87 Freisetzung von IL-8 bei der Bilayer-Ko-Kultur von NCI H441 mit HPMEC nach Stimulation mit TNF- α und IFN- γ . Apikale und basolaterale Freisetzung von IL-8 bei Ko-Kultur von NCI H441 (P21) mit HPMEC (P4) in Ko-Kulturmedium mit Dexamethason nach 24-stündiger Inkubation ohne Stimulanz bzw. nach apikaler (linker Transwell) oder basolateraler (rechter Transwell) Stimulation mit TNF- α (300 U/ml), IFN- γ (2000 U/ml) sowie TNF- α (300 U/ml) + IFN- γ (2000 U/ml). Mittelwert \pm SD. n=3 (Vorkultur 10d). IL-8 wird nach apikaler und basolateraler Zugabe von TNF- α und TNF- α + IFN- γ sowohl ipsilateral als auch contralateral erhöht freigesetzt.

Eine vermehrte Freisetzung von MCP-1 auf epithelialer Seite (apikal) wurde weder nach apikaler noch nach basolateraler Stimulation mit TNF- α und TNF- α + IFN- γ induziert (Abb. 88). Bei den absolut produzierten Mengen von MCP-1 nach Stimulation mit TNF- α differierten Mono- und Ko-Kultur der HPMEC. Nach basolateraler Stimulation der Ko-Kultur mit TNF- α wurden *ipsilateral* 4209 \pm 500 pg/cm² MCP-1 (Abb. 88, rechter Transwell) bei der Mono-Kultur von HPMEC jedoch nur 737 \pm 383 pg MCP-1 pro cm² konfluenter Zellrasen sezerniert (siehe Abb. 56, S. 114).

RANTES wurde weder nach apikaler noch nach basolateraler Stimulation auf epithelialer Seite gemessen (Abb. 89). Nach basolateraler Stimulation der Bilayer-Ko-Kultur mit TNF- α lag die *ipsilaterale* Freisetzung von RANTES (Abb. 89, rechter Transwell) in ähnlicher Größenordnung wie die Freisetzung von RANTES bei HPMEC in Mono-Kultur [297 \pm 66 pg/cm² RANTES in Ko-Kultur bzw. 150 \pm 13 pg/cm² in Mono-Kultur (Abb. 57, S. 114)]. Die basolaterale Gabe von TNF- α + IFN- γ hatte eine starke ko-stimulatorische Wirkung auf die *ipsilaterale* Freisetzung von RANTES und erhöhte dessen Freisetzung um ca. 9fach (Abb. 89, rechter Transwell).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass HPMEC in Ko-Kultur mit Dexamethason-behandelten NCI H441 auf Stimulation mit TNF- α ähnlich reaktiv waren wie in Mono-Kultur ohne Dexamethason. NCI H441 verhielten sich in Ko-Kultur ähnlich wie die Mono-Kulturen von NCI H441, die 10 Tage mit Dexamethason behandelt wurden. Die Barriere der Bilayer-Ko-Kultur war trotz abfallender TER-Werte nach 24-stündiger Stimulation mit TNF- α oder TNF- α + IFN- γ noch soweit intakt, dass das eindeutig von HPMEC produzierte Zytokin RANTES nach basolateraler Stimulation nicht im Mediumüberstand des oberen Wells (*contralateral*) gemessen werden konnte. Der Aufbau einer funktionellen Barriere ließ für die Bilayer-Ko-Kultur von NCI H441 und HPMEC zwei getrennte Kompartimente entstehen: das obere Well (apikal), das dem Alveolarlumen entspricht, und das untere Well (basolateral), das dem vaskulären Lumen entspricht. Diese beiden Kompartimente erlaubten keinen parazellulären Durchtritt von den nach Stimulation sezernierten sekundären Zytokinen durch die Bilayer-Ko-Kultur. Außer IL-8 war bei keinem der Zytokine eine stimulationsinduzierte *contralaterale* Freisetzung nach 24-stündiger Stimulation mit TNF- α oder TNF- α + IFN- γ nachweisbar.

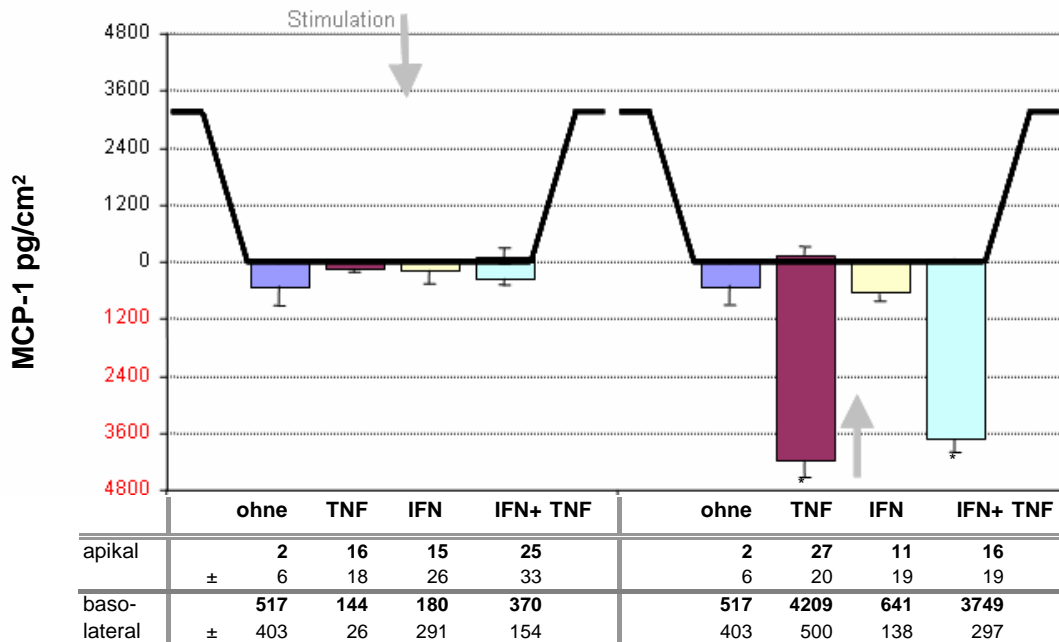


Abb. 88 Freisetzung von MCP-1 bei der Bilayer-Ko-Kultur von NCI H441 mit HPMEC nach Stimulation mit TNF- α und IFN- γ . Apikale und basolaterale Freisetzung von MCP-1 bei Ko-Kultur von NCI H441 (P21) mit HPMEC (P4) in Ko-Kulturmedium mit Dexamethason nach 24-stündiger Inkubation ohne Stimulanz bzw. nach apikaler (linker Transwell) oder basolateraler (rechter Transwell) Stimulation mit TNF- α (300 U/ml), IFN- γ (2000 U/ml) sowie TNF- α (300 U/ml) + IFN- γ (2000 U/ml). Mittelwert \pm SD. n=3 (Vorkultur 10d). MCP-1 wird nach basolateraler Zugabe von TNF- α und von TNF- α + IFN- γ ipsilateral signifikant erhöht freigesetzt.

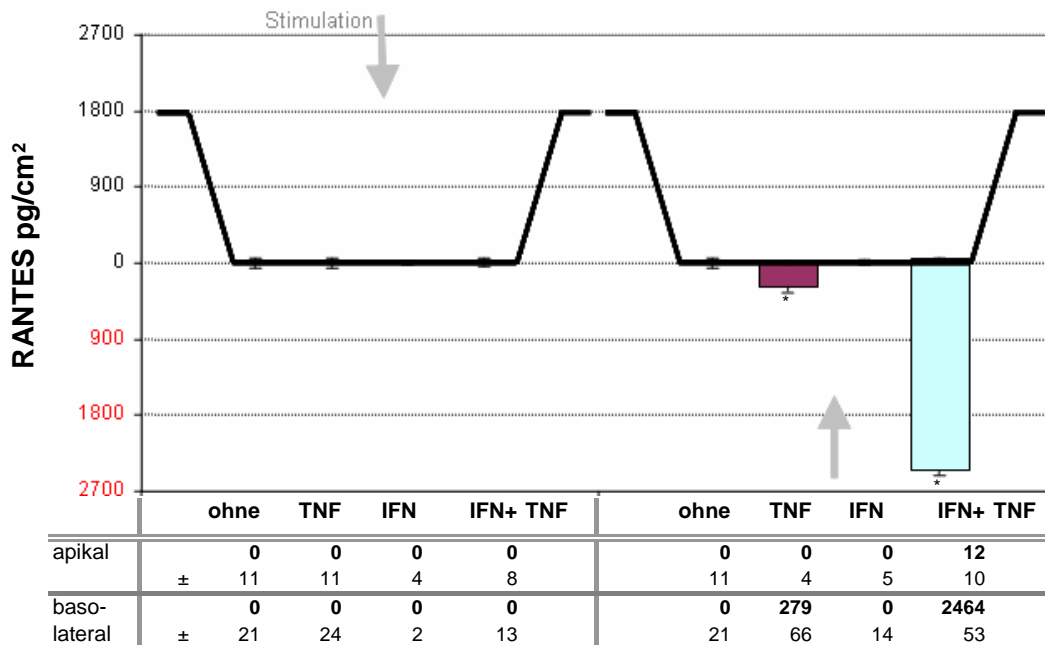


Abb. 89 Freisetzung von RANTES bei der Bilayer-Ko-Kultur von NCI H441 mit HPMEC nach Stimulation mit TNF- α und IFN- γ . Apikale und basolaterale Freisetzung von RANTES bei Ko-Kultur von NCI H441 (P21) mit HPMEC (P4) in Ko-Kulturmedium mit Dexamethason nach 24-stündiger Inkubation ohne Stimulanz bzw. nach apikaler (linker Transwell) oder basolateraler (rechter Transwell) Stimulation mit TNF- α (300 U/ml), IFN- γ (2000 U/ml) sowie TNF- α (300 U/ml) + IFN- γ (2000 U/ml). Mittelwert \pm SD. n=3 (Vorkultur 10d). RANTES wird von HPMEC nach basolateraler Zugabe von TNF- α und ko-stimulatorisch von TNF- α + IFN- γ ipsilateral freigesetzt.

3.12.3 Stimulation der Ko-Kultur von Epithelzellisolaten (P0) und HPMEC mit TNF- α und IFN- γ

3.12.3.1 TER-Werte nach Stimulation der primären Ko-Kultur mit TNF- α und IFN- γ

Die primäre Ko-Kultur von hATII und HPMEC wurde mit SAGM 1% FKS im oberen Well und PC 15% FKS, bFGF/Heparin (2,5ng/10 μ g/ml) im unteren Well durchgeführt. Dabei wurden hATII Zellen in P0 eingesetzt und zeigten in SAGM 1% FKS nach 7-10 Tagen morphologische Phänotypen von hATII Zellen und hATI-ähnlichen Zellen (siehe Abb. 78, S. 144).

Erste Versuche zur Stimulation der Primärzellen in Ko-Kultur werden in folgendem Kapitel dargestellt. Die Ko-Kultur von hATII Zellen in P0 mit HPMEC wurde bei Erreichen eines TER-Wertes $>1000 \Omega \times \text{cm}^2$, hier Tag 7 der Ko-Kultur, von der endothelialen Seite (unteres Well, basolateral) bzw. von der epithelialen Seite (oberes Well, apikal) zunächst für 24 h in Medium mit TNF- α (300 U/ml), IFN- γ (2000 U/ml) sowie TNF- α (300 U/ml) + IFN- γ (2000 U/ml) stimuliert. Nach 24 h und 48 h erfolgte ein Mediumwechsel und es wurden die Stimulanzien in gleicher Konzentration für weitere 24 h zugegeben. Die Messung der TER-Werte wurde am Tag 8, Tag 9 und Tag 10, also 24, 48 und 72 h nach Stimulation, durchgeführt.

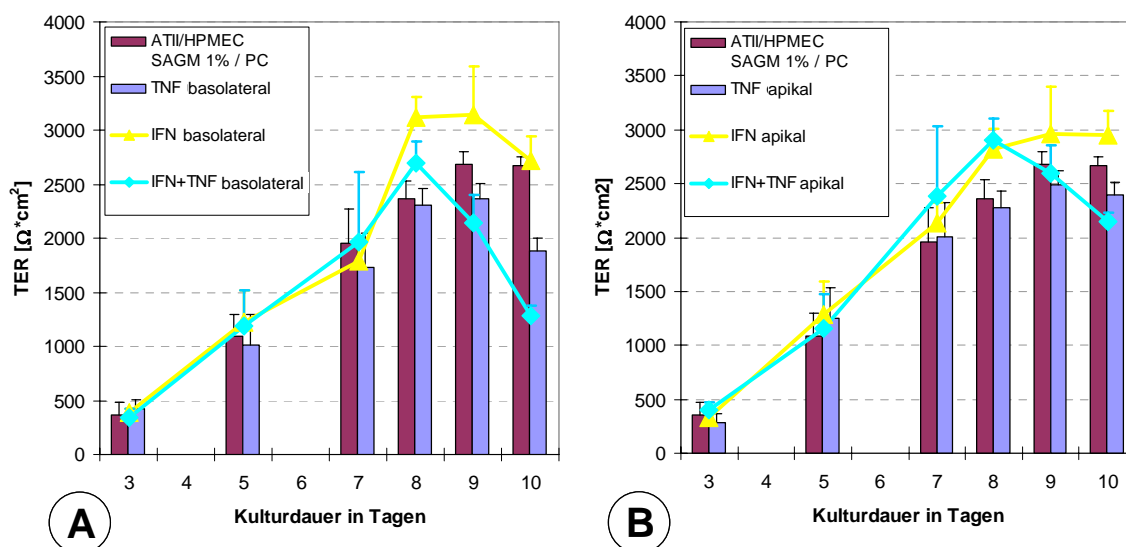


Abb. 90 TER-Werte nach Stimulation der Ko-Kulturen von hATII Zellen in P0 und HPMEC mit TNF- α und IFN- γ für 24 h bzw. 48 h. hATII Zellen (P0) und HPMEC (P4) in SAGM 1%/PC 15 (o/u) ohne Stimulanz (■) und nach basolateraler (A) und apikaler (B) Stimulation mit 300 U/ml TNF- α (■) bzw. 2000 U/ml IFN- γ (▲) oder beiden Zytokinen (◆). Erneute Stimulation nach 24-stündiger und 48-stündiger Inkubation. Mittelwert \pm SD (n=3, Vorkultur 7d). TNF- α verursachte nur basolateral zugegeben eine signifikante Erniedrigung des TER-Wertes nach 72h. Die Bilayer-Ko-Kultur reagierte nach 72h auf apikale Gabe von TNF- α + IFN- γ mit gegenüber der unbehandelten Kontrolle reduzierten TER-Werten. Basolateral zugegeben wurden die TER-Werte durch TNF- α + IFN- γ nach 24h um ca. 15% und nach 72h um ca. 43% erniedrigt.

Die apikale Gabe von 300 U/ml TNF- α alleine verursachte keine reduzierten TER-Werte innerhalb von 72 h (Abb. 90B) während bei basolateraler Stimulation mit TNF- α die TER-Werte nach 72 h auf $70 \pm 5\%$ der unbehandelten Kontrolle reduziert wurden (Abb. 90A). IFN- γ löste apikal zugegeben keine gegenüber der Kontrolle veränderte Reaktion innerhalb der 72-stündigen Stimulation aus. Bei

basolateraler Stimulation mit $\text{IFN-}\gamma$ waren die TER-Werte leicht erhöht. Die Kombination von 300 U/ml $\text{TNF-}\alpha$ + 2000 U/ml $\text{IFN-}\gamma$, basolateral zugegeben, zeigte nach 48-stündiger bzw. 72-stündiger Inkubation eine gegenüber der unbehandelten Kontrolle deutliche Reduktion der TER-Werte um ca. 15% bzw. 43% (Abb. 90A).

3.12.3.2 Parazellulärer Transport von Natrium-Fluoreszein bei Stimulation mit $\text{TNF-}\alpha$ und $\text{IFN-}\gamma$

48 h nach Stimulation mit 300 U/ml $\text{TNF-}\alpha$ bzw. 2000 U/ml $\text{IFN-}\gamma$ und beiden Stimulanzen in Kombination wurde analog der Erniedrigung des TER-Werts der Transport von Natrium-Fluoreszein untersucht. Die Transportexperimente wurden in serumhaltigem Ko-Kulturmedium durchgeführt. Da die Ko-Kulturen bereits durch die Stimulation aktiviert waren, sollte eine zusätzliche Beeinflussung der Primärzellen durch Einsatz des serumfreien Krebs-Ringer-Puffers vermieden werden.

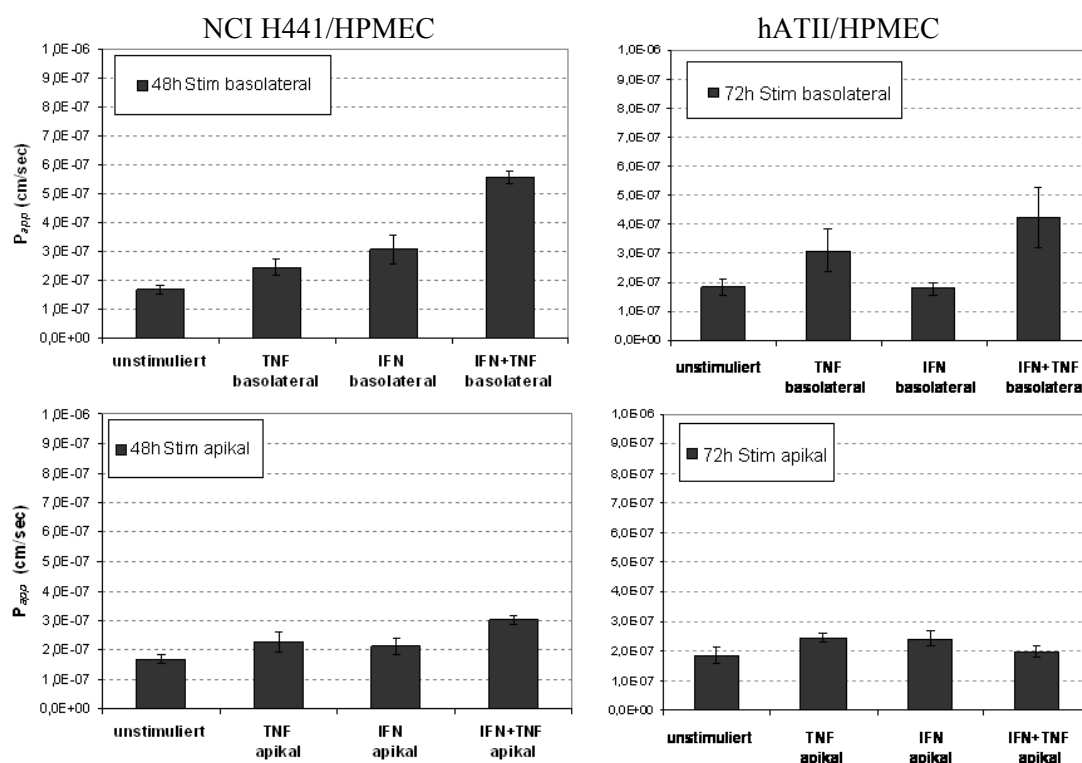


Abb. 91 Permeabilitätskoeffizienten (P_{app} -Werte) für den Transport von Natrium-Fluoreszein durch Bilayer-Ko-Kulturen von NCI H441 bzw. hATII Zellen mit HPMEC nach Stimulation. P_{app} -Werte für den parazellulären Transport von Natrium-Fluoreszein durch Zell-Layer von NCI H441 in Ko-Kultur mit HPMEC in RP/MC + 1 μM Dexamethason nach 48-stündiger Stimulation (links) und durch Zell-Layer von hATII Zellen in Ko-Kultur mit HPMEC 72-stündiger Stimulation (rechts). Stimulation mit 300 U/ml $\text{TNF-}\alpha$ bzw. 2000 U/ml $\text{IFN-}\gamma$ oder beiden Zytokinen. Zugabe der Stimulanzen alle 24h. Mittelwert \pm SD ($n=3$). Apikal verursachten $\text{TNF-}\alpha$ und $\text{IFN-}\gamma$ alleine keine signifikante Erhöhung des Permeabilitätskoeffizienten (P_{app}). Während die Bilayer-Ko-Kultur mit NCI H441/HPMEC bereits auf eine 48-stündige apikale Gabe von $\text{TNF-}\alpha$ + $\text{IFN-}\gamma$ mit einer gegenüber der unbehandelten Kontrolle 1,7-1,8fachen Erhöhung des P_{app} reagierte, zeigte die Bilayer-Ko-Kultur der Primärzellen keine Erhöhung. Basolateral zugegeben wurde der P_{app} nach 72-stündiger Stimulation durch $\text{TNF-}\alpha$ signifikant um 1,7fach gegenüber der unstimulierten Kontrolle erhöht (1,5fach nach 48h bei NCI H441/HPMEC). Nach 48-stündiger bzw. 72-stündiger Stimulation hatte die basolaterale Gabe von $\text{TNF-}\alpha$ + $\text{IFN-}\gamma$ den größten Effekt auf den Permeabilitätskoeffizienten beider Bilayer-Ko-Kulturen. Der P_{app} nach basolateraler Gabe von $\text{TNF-}\alpha$ + $\text{IFN-}\gamma$ für 72 h war bei der Bilayer-Ko-Kulturen der Primärzellen um ca. 2,3fach höher als der P_{app} der unstimulierten Kontrolle.

Nach 72-stündiger basolaterale Gabe von TNF- α + IFN- γ wurde der Permeabilitätskoeffizient (P_{app}) der Bilayer-Ko-Kultur der Primärzellen am stärksten erhöht. Der P_{app} der hATII/HPMEC mit $0,425 \pm 0,103 \times 10^{-6}$ cm/sec war 2,3fach höher als der P_{app} der unbehandelten Kontrolle mit $0,184 \pm 0,027 \times 10^{-6}$ cm/sec. Die Bilayer-Ko-Kultur von NCI H441/HPMEC lieferte nach 48-stündiger basolateraler Stimulation P_{app} -Werte in vergleichbarer Höhe (Abb. 91). Nach 72-stündiger basolateraler Stimulation mit TNF- α war der P_{app} bei hATII/HPMEC mit $0,309 \pm 0,074 \times 10^{-6}$ cm/sec gegenüber der unstimulierten Kontrolle ca. 1,7fach erhöht. NCI H441/HPMEC zeigten bereits nach 48-stündiger basolateraler Stimulation mit TNF- α mit einem P_{app} von $0,247 \pm 0,026 \times 10^{-6}$ cm/sec eine Erhöhung des Permeabilitätskoeffizienten gegenüber der unstimulierten Kontrolle um ca. 1,5fach.

3.12.3.3 Expression von Zelladhäsionsmolekülen (Cell Adhesion Molecules, CAMs)

Die Ko-Kulturen der Primärzellen wurden bei Erreichen eines TER-Wertes $>1000 \Omega \times \text{cm}^2$ für 24 h entweder von der endothelialen Seite (unteres Well, basolateral) oder von der epithelialen Seite (oberes Well, apikal) mit Zytokinen stimuliert. Anschließend wurden die Mediumüberstände der oberen (apikalen) und unteren (basolateralen) Wells getrennt gesammelt und in Dreifachbestimmung mittels ELISA die Freisetzung der löslichen Formen von ICAM-1 und VCAM-1, sICAM-1 und sVCAM-1 gemessen. Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf die absolute Menge der Substanz (CAM oder Zytokin) im Mediumüberstand in pg pro cm^2 konfluenter Zellrasen. Die Abbildungen haben die gleiche Struktur, wie bereits für die Bilayer-Ko-Kultur von NCI H441 und HPMEC verwendet (Abb. 83, S. 152).

Da für die Ko-Kultur der Primärzellen der Serumgehalt in Endothelzellmedium (PC mit 15% FKS) höher war als im Ko-Kulturmedium (MCDB 131, bFGF (2,5 ng/ml), Heparin (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) mit 5% FKS) und auch die Hersteller der Epithelzellmedien unterschiedlich waren, konnten die absolut produzierten Mengen an sICAM-1 und sVCAM-1 nicht direkt mit denen der Ko-Kultur von NCI H441 mit HPMEC verglichen werden. Es wurden daher in den folgenden Experimenten die relativen Expressionsmuster der nach Stimulation mit TNF- α und IFN- γ freigesetzten löslichen Zelladhäsionsmoleküle bei der Bilayer-Ko-Kultur von Primärzellen ermittelt.

Wurde von der epithelialen Seite (apikal) stimuliert, so waren die Konzentrationen von sICAM-1 und sVCAM-1 im *contralateralen* Well im Vergleich zur Kontrolle nicht verändert (Abb. 92 und 93, linker Transwell). Nach basolateral Zugabe der Zytokine wurde durch TNF- α und verstärkt durch die Kombination beider Zytokine (TNF- α + IFN- γ) eine *ipsilaterale* Freisetzung von sICAM-1 und sVCAM-1 induziert (Abb. 92 und 93, rechter Transwell). Wie bei der Bilayer-Ko-Kultur von NCI H441 mit HPMEC (Abb. 84, S. 153) wurden auch bei der Bilayer-Ko-Kultur der Primärzellen unabhängig von einer Stimulation apikal hohe Mengen sICAM-1 pro cm^2 konfluentem Zellrasen ins obere Well abgegeben (Abb. 92). Wie die Ko-Kultur von NCI H441 mit HPMEC (Abb. 85, S. 154) zeigten auch die hATII Zellen in P0 in Ko-Kultur mit HPMEC keine apikale Freisetzung von sVCAM-1 nach Stimulation mit TNF- α und IFN- γ (Abb. 93).

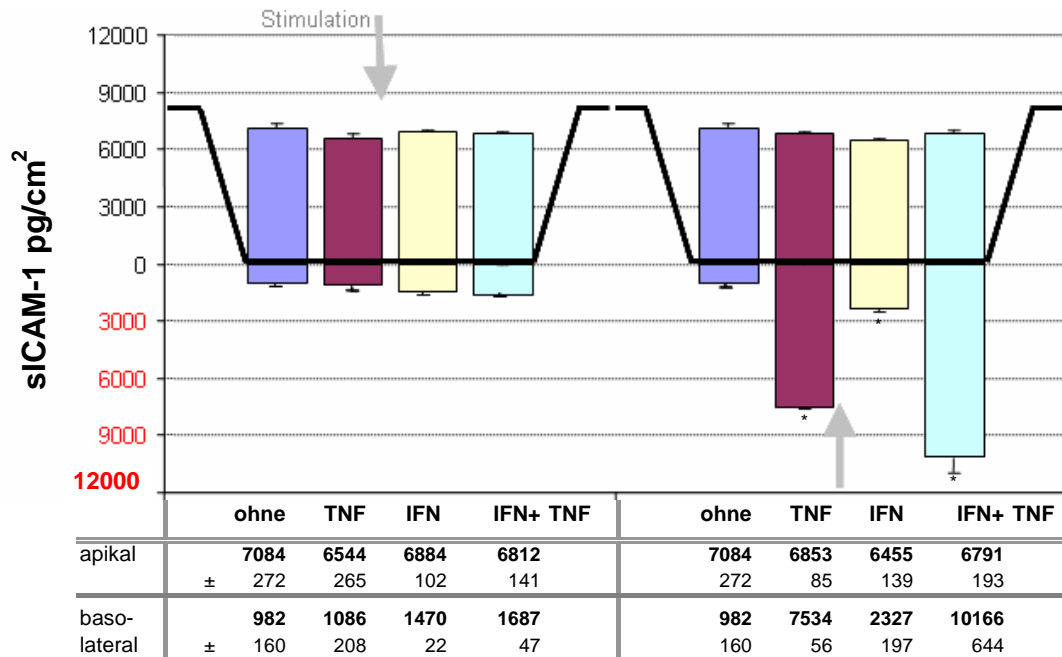


Abb. 92 Freisetzung von sICAM-1 bei der Bilayer-Ko-Kultur von hATII Zellen (P0) mit HPMEC nach Stimulation mit TNF- α und IFN- γ . Apikale und basolaterale Freisetzung von sICAM-1 bei der Ko-Kultur von hATII Zellen (P0) mit HPMEC (P3) in SAGM 1% FKS (oben) und PC 15% FKS (unten) nach 24-stündiger Inkubation ohne Stimulanz bzw. nach apikaler (linker Transwell) oder basolateraler (rechter Transwell) Stimulation mit TNF- α (300 U/ml), IFN- γ (2000 U/ml) sowie TNF- α (300 U/ml) + IFN- γ (2000 U/ml). Mittelwert \pm SD (n=3, Vorkultur 7d). Die basolaterale Zugabe von TNF- α , IFN- γ und von TNF- α + IFN- γ erhöht die ipsilaterale Freisetzung von sICAM-1.

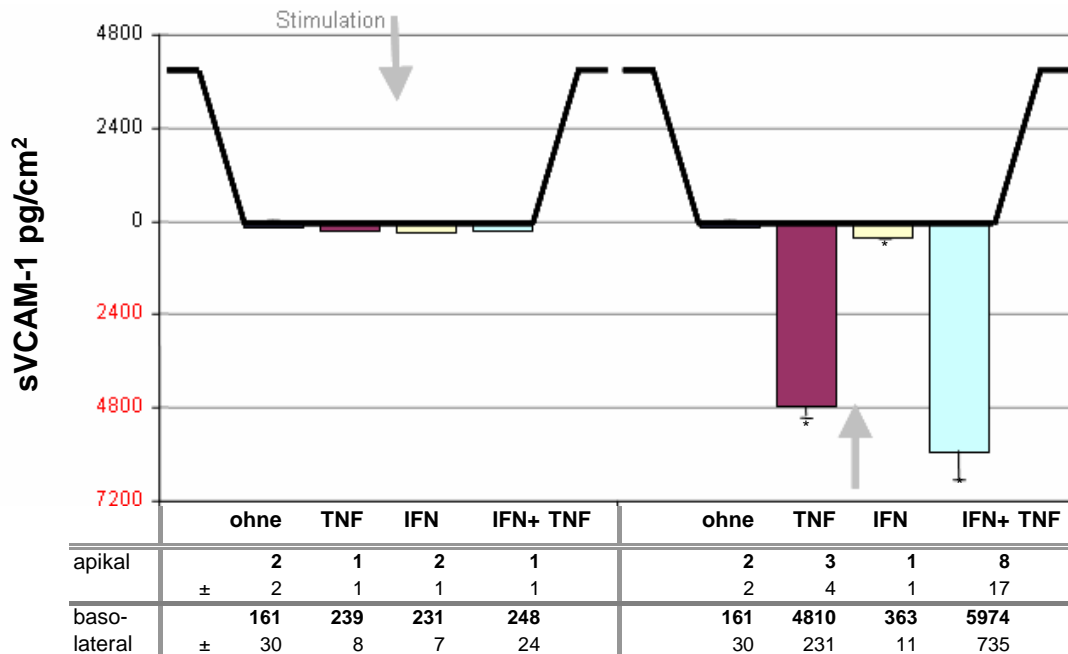


Abb. 93 Freisetzung von sVCAM-1 bei der Bilayer-Ko-Kultur von hATII Zellen (P0) mit HPMEC nach Stimulation mit TNF- α und IFN- γ . Apikale und basolaterale Freisetzung von sVCAM-1 bei der Ko-Kultur von hATII Zellen (P0) mit HPMEC (P3) in SAGM 1% FKS (oben) und PC 15% FKS (unten) nach 24-stündiger Inkubation ohne Stimulanz bzw. nach apikaler (linker Transwell) oder basolateraler (rechter Transwell) Stimulation mit TNF- α (300 U/ml), IFN- γ (2000 U/ml) sowie TNF- α (300 U/ml) + IFN- γ (2000 U/ml). Mittelwert \pm SD (n=3, Vorkultur 7d). sVCAM-1 wird von HPMEC nach basolateraler Zugabe von TNF- α , IFN- γ und von TNF- α + IFN- γ ipsilateral freigesetzt.

3.12.3.4 Freisetzung sekundärer inflammatorischer Mediatoren

Zusätzlich zur Bestimmung der löslichen Formen der Zelladhäsionsmoleküle wurden die Mediumüberstände der primären Ko-Kulturen auf die Freisetzung der Zytokine IL-6, IL-8, MCP-1 und RANTES hin untersucht. Da die Ko-Kultur der Primärzellen wegen der besonderen Mediumansprüche der Primärzellen nicht im gleichen Medium wie die Ko-Kultur von NCI H441 mit HPMEC stattfand, konnten die absolut freigesetzten Zytokinmengen nicht direkt mit denen der Ko-Kultur von NCI H441 mit HPMEC verglichen werden. Daher wurden die relativen Expressionsmuster der Zytokine nach Stimulation mit TNF- α und IFN- γ mit denen der Bilayer-Ko-Kultur von NCI H441 mit HPMEC verglichen.

Im Gegensatz zur Ko-Kultur von NCI H441 mit HPMEC, bei der die apikale Freisetzung von IL-6 durch Stimulation nicht erhöht wurde, konnte bei der Ko-Kultur der Primärzellen eine gegenüber der unstimulierten Kontrolle leicht erhöhte *ipsilaterale* Freisetzung von IL-6 nach apikaler Stimulation mit TNF- α und TNF- α + IFN- γ nachgewiesen werden (Abb. 94, linker Transwell). Nach basolateraler Stimulation mit TNF- α wurde IL-6 *ipsilateral* und nach basolateraler Stimulation mit TNF- α + IFN- γ sowohl *ipsilateral* als auch *contralateral* erhöht freigesetzt (Abb. 94, rechter Transwell).

IL-8 wurde bei der Ko-Kultur der Primärzellen ähnlich wie bei der Ko-Kultur von NCI H441 mit HPMEC unabhängig von der Stimulationsseite sowohl *ipsilateral* als auch *contralateral* durch TNF- α und TNF- α + IFN- γ stimulationsinduziert freigesetzt (Abb. 95). So wurde nach basolateraler Gabe von TNF- α sowie TNF- α + IFN- γ , d.h. nach Stimulation auf endothelialer Seite, eine apikale Freisetzung von IL-8 gemessen (Abb. 95, rechter Transwell). Dabei betrug die *contralateral* sezernierte Menge an IL-8 nach basolateraler Stimulation (Abb. 95, rechter Transwell) etwa 1/4 der nach apikaler Stimulation *ipsilateral* sezernierten Menge von IL-8 (Abb. 95, linker Transwell). Auch nach apikaler Stimulation mit TNF- α sowie TNF- α + IFN- γ war eine gegenüber der unstimulierten Kontrolle deutlich erhöhte Konzentration von IL-8 im unteren Well (*contralateral*) messbar (Abb. 95, linker Transwell). Die nach basolateraler Stimulation *ipsilateral* freigesetzte Menge an IL-8 (Abb. 95, rechter Transwell) war jedoch 3-7fach höher als die nach apikaler Stimulation *contralateral* pro cm² Zellrasen freigesetzte Menge von IL-8 (Abb. 95, linker Transwell).

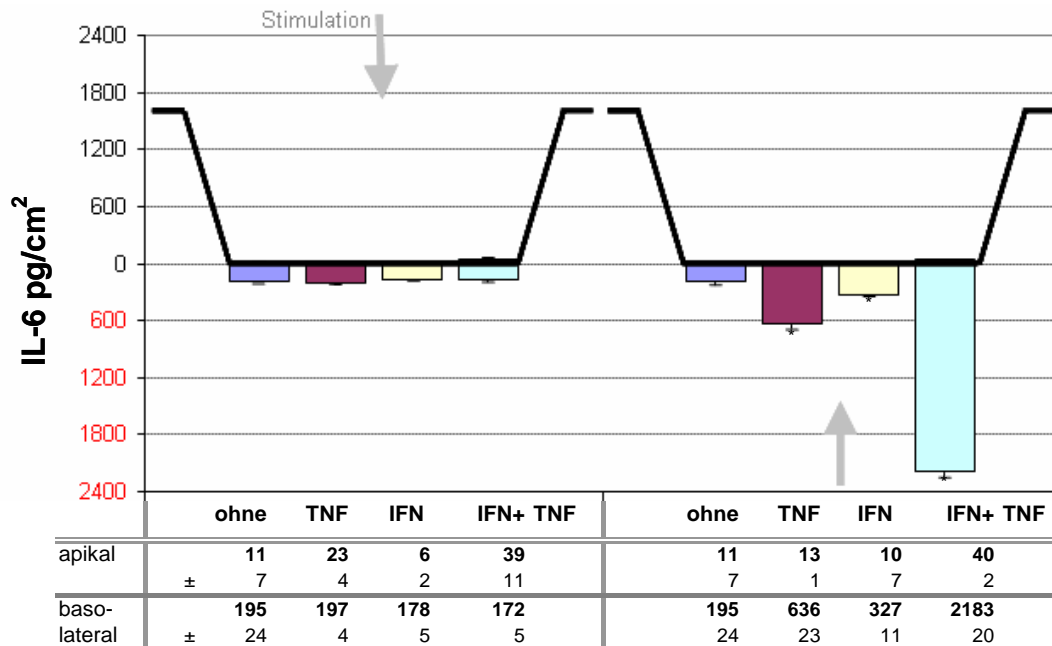


Abb. 94 Freisetzung von IL-6 bei der Bilayer-Ko-Kultur von hATII Zellen (P0) mit HPMEC nach Stimulation mit TNF- α und IFN- γ . Apikale und basolaterale Freisetzung von IL-6 bei Ko-Kultur von hATII Zellen (P0) mit HPMEC (P3) in SAGM 1% FKS (oben) und PC 15% FKS (unten) nach 24-stündiger Inkubation ohne Stimulanz bzw. nach apikaler (linker Transwell) oder basolateraler (rechter Transwell) Stimulation mit TNF- α (300 U/ml), IFN- γ (2000 U/ml) sowie TNF- α (300 U/ml) + IFN- γ (2000 U/ml). Mittelwert \pm SD (n=3, Vorkultur 7d). IL-6 wird nach apikaler Zugabe von TNF- α und TNF- α + IFN- γ ipsilateral und nach basolateraler Zugabe von TNF- α + IFN- γ ipsilateral und contralateral erhöht freigesetzt.

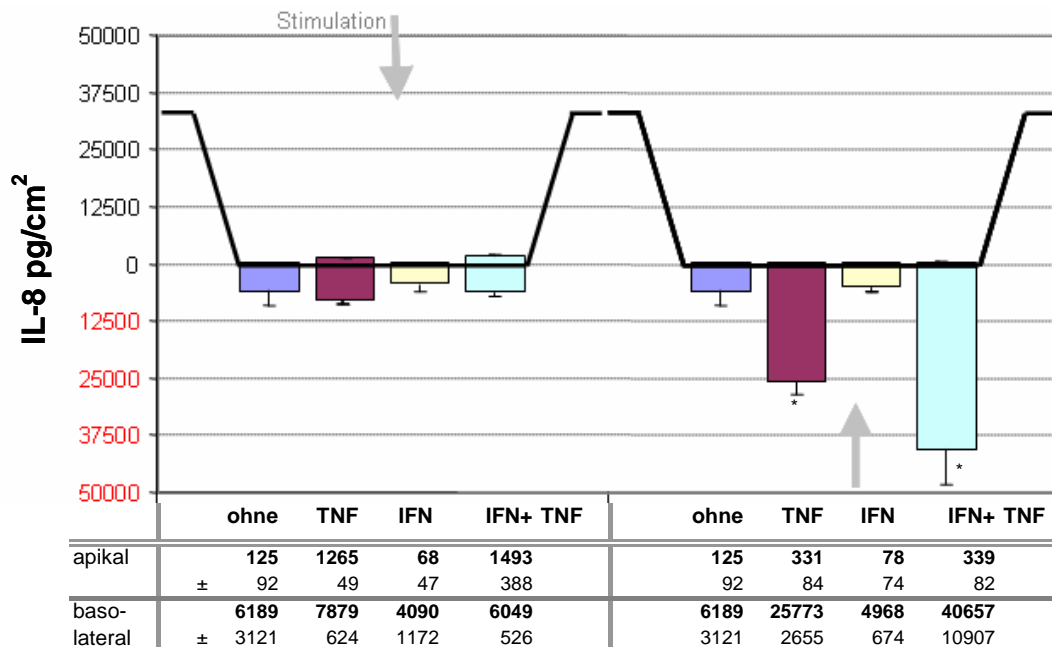


Abb. 95 Freisetzung von IL-8 bei der Bilayer-Ko-Kultur von hATII Zellen (P0) mit HPMEC nach Stimulation mit TNF- α und IFN- γ . Apikale und basolaterale Freisetzung von IL-8 bei Ko-Kultur von hATII Zellen (P0) mit HPMEC (P3) in SAGM 1% FKS (oben) und PC 15% FKS (unten) nach 24-stündiger Inkubation ohne Stimulanz bzw. nach apikaler (linker Transwell) oder basolateraler (rechter Transwell) Stimulation mit TNF- α (300 U/ml), IFN- γ (2000 U/ml) sowie TNF- α (300 U/ml) + IFN- γ (2000 U/ml). Mittelwert \pm SD (n=3, Vorkultur 7d). IL-8 wird nach apikaler und basolateraler Zugabe von TNF- α und TNF- α + IFN- γ sowohl ipsilateral als auch contralateral erhöht freigesetzt.

Bei der Ko-Kultur der Primärzellen wurde eine apikale Freisetzung von MCP-1 sowohl nach apikaler als auch nach basolateraler Stimulation nachgewiesen. Im Unterschied zur Ko-Kultur von NCI H441 mit HPMEC mit einer geringen apikalen MCP-1 Freisetzung um 20 pg/cm² (Abb. 88, S. 158), wurde bei der Ko-Kultur der Primärzellen eine stimulationsinduzierte apikale Freisetzung von MCP-1 nachgewiesen. Dabei betrug die *contralateral* freigesetzte Menge an MCP-1 nach basolateraler Stimulation (Abb. 96, rechter Transwell) 1/3 bis 1/5 der nach apikaler Stimulation *ipsilateral* sezernierten Menge von MCP-1 (Abb. 96, linker Transwell).

Wie bei der Ko-Kultur von NCI H441 mit HPMEC wurde bei der Ko-Kultur von hATII Zellen mit HPMEC kein RANTES ins obere Well freigesetzt. Ähnlich der Bilayer-Ko-Kultur von NCI H441 mit HPMEC wurde bei der Bilayer-Ko-Kultur der Primärzellen nach basolateraler Gabe von TNF- α *ipsilateral* 263 \pm 68 pg RANTES pro cm² freigesetzt, während TNF- α + IFN- γ ko-stimulatorisch die *ipsilaterale* Freisetzung von 4402 \pm 549 pg RANTES pro cm² konfluenter HPMEC auslösten.

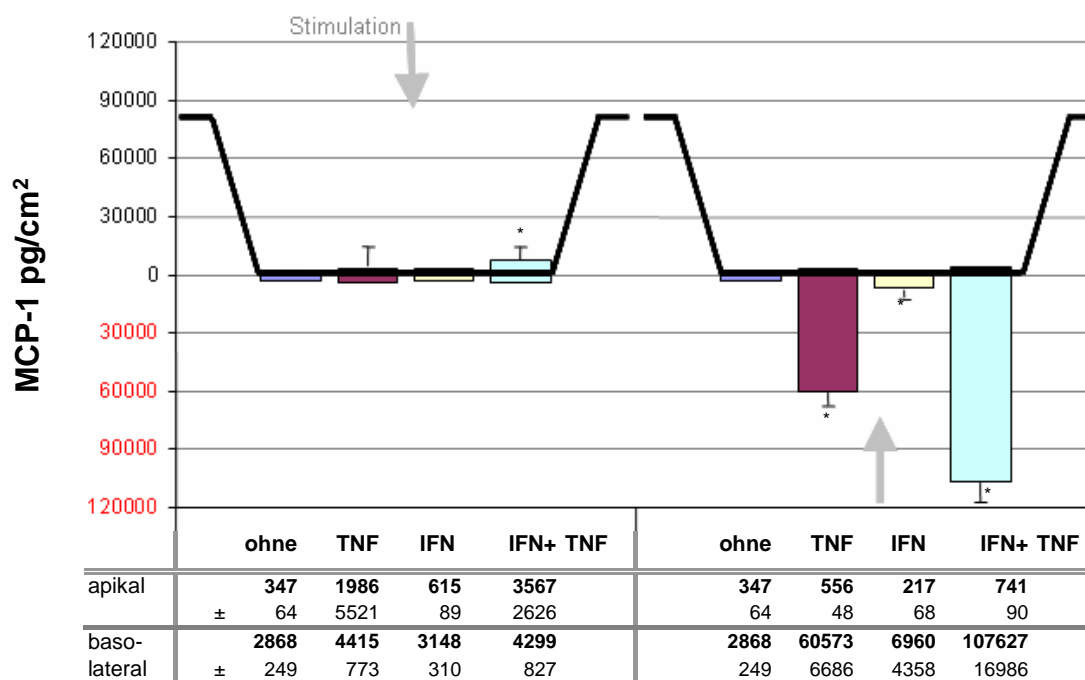


Abb. 96 Freisetzung von MCP-1 bei der Bilayer-Ko-Kultur von hATII Zellen (P0) mit HPMEC nach Stimulation mit TNF- α und IFN- γ . Apikale und basolaterale Freisetzung von MCP-1 bei Ko-Kultur von hATII Zellen (P0) mit HPMEC (P3) in SAGM 1% FKS (oben) und PC 15% FKS (unten) nach 24-stündiger Inkubation ohne Stimulanz bzw. nach apikaler (linker Transwell) oder basolateraler (rechter Transwell) Stimulation mit TNF- α (300 U/ml), IFN- γ (2000 U/ml) sowie TNF- α (300 U/ml) + IFN- γ (2000 U/ml). Mittelwert \pm SD (n=3, Vorkultur 7d). MCP-1 wird nach apikaler Zugabe von TNF- α und TNF- α + IFN- γ *ipsilateral* und nach basolateraler Zugabe sowohl *ipsilateral* als auch *contralateral* erhöht freigesetzt.

Die vorangegangenen Kapitel zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass Bilayer-Ko-Kulturen von hATII Zellen in P0 mit HPMEC eine funktionelle Barriere aufbauen, die durch Stimulation mit inflammatorischen Zytokinen beeinflusst wird. Außer einer direkten Wirkung der Zytokine auf die Barrierefunktion konnte die Freisetzung sekundärer immunmodulatorischer Mediatoren bei hATII Zellen und HPMEC induziert werden. Die Barriere war nach 24-stündiger Stimulation mit TNF- α + IFN- γ noch soweit intakt, dass das eindeutig von HPMEC produzierte Zytokin RANTES nicht im Mediumüberstand des oberen Wells (*contralateral*) gemessen werden konnte. Ebenfalls konnte keine *contralaterale* Freisetzung von sVCAM-1 ins obere Well gezeigt werden. Unter der Voraussetzung dass eine intakte Barriere zwei getrennte Kompartimente entstehen lässt, das eine oberhalb der Epithelzellen (oberes Well, apikal) das andere oberhalb der Endothelzellen (unteres Well, basolateral), setzten sowohl hATII Zellen in P0 in Bilayer-Ko-Kultur als auch hATII Zellen in zweiter Passage in Mono-Kultur kein RANTES und kein sVCAM-1 frei.

Wie die primären Bilayer-Ko-Kulturen zeigten Bilayer-Ko-Kulturen von NCI H441 mit HPMEC im Hinblick auf die Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 sowie die Zytokine IL-8, RANTES und MCP-1 ähnliche relative Expressionsmuster. Die Freisetzung von MCP-1 ins apikale Well war dabei bei Bilayer-Ko-Kulturen von NCI H441 mit HPMEC wesentlich geringer als bei den Ko-Kulturen der Primärzellen. Im Gegensatz zu den primären Ko-Kulturen wurde die Freisetzung von IL-6 ins apikale Well durch Stimulation mit TNF- α und TNF- α + IFN- γ bei Ko-Kulturen von NCI H441 mit HPMEC nicht erhöht. Die im apikalen Well, d.h. oberhalb der Epithelzellen, gemessenen Mengen von IL-6 und MCP-1 waren jedoch im Vergleich zu den basolateral gemessenen Mengen gering und entsprachen nur ca. 2%-3% der Menge an IL-6 bzw. MCP-1, die nach basolateraler Stimulation pro cm^2 konfluenter Zellrasen *ipsilateral* freigesetzt wurden.

4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, als *in vitro* Modell einer humanen respiratorischen Einheit Bilayer-Ko-Kulturen von Alveolarepithelzellen und mikrovaskulären Endothelzellen zu etablieren. Da menschliche Zellen nicht beliebig verfügbar sind und biologischer Parameter bei Primärzellen individuell variieren, sollte ein reproduzierbares *in vitro* Modell aus Ko-Kulturen einer epithelialen mit einer endothelialen Zell-Linie aufgebaut werden. Humane Zell-Linien mit Eigenschaften von Typ I Alveolarepithelzellen sind bisher nicht bekannt. Demgegenüber zeigen einige Adenokarzinom Zell-Linien der Lunge, wie z.B. die Zell-Linie A549, Eigenschaften von Typ II Alveolarepithelzellen (Lieber et al., 1976; Standiford et al., 1990; Standiford et al., 1991; Rosenthal et al., 1994). Eine Veränderung bzw. Schädigung von Typ II Alveolarepithelzellen kann als prognostischer Marker für die Integrität des Alveolarraums dienen, da eine Veränderung dieses Zelltyps Einfluss auf viele metabolische Vorgänge im Alveolarraum und auf die Regeneration von Typ I Alveolarepithelzellen hat. Ein *in vitro* Ko-Kultur Modell einer mikrovaskulären Endothelzell-Linie mit einer Epithelzell-Linie, die Eigenschaften von Typ II Zellen hat, mag das alveoläre Epithel mit Alveolarepithelzellen vom Typ II und vom Typ I nicht komplett nachahmen. Es ermöglicht jedoch das Studium der Interaktion von zwei für die Integrität der alveolo-kapillären Einheit essentiellen Zelltypen, den Alveolarepithelzellen vom Typ II und den mikrovaskulären Endothelzellen. Beide sind metabolisch und inflammatorisch aktiv und sind durch die Aufrechterhaltung der alveolo-kapillären Barriere wichtige Zielzellen bei pathophysiologischen, toxikologischen oder auch pharmakologischen Fragestellungen.

Um die Ähnlichkeit des Bilayer-Ko-Kultur Modells der Zell-Linien mit primär isolierten Zellen zu untersuchen, wurde eine Bilayer-Ko-Kultur aus Primärzellen etabliert und die Eigenschaften beider Ko-Kulturen im Hinblick auf die Ausbildung einer funktionellen Barriere und die Stimulierbarkeit miteinander verglichen.

4.1 Isolierung und Charakterisierung humaner Alveolarepithelzellen vom Typ II

Eine Methode zur Isolierung von mikrovaskulären Endothelzellen den menschlichen Lunge (HPMEC) aus peripherem Lungengewebe wurde bereits in der eigenen Diplomarbeit entwickelt (Hermanns, 1997). Um hATII Zellen aus humanem Lungengewebe zu isolieren, wurde die gleiche enzymatische Behandlung wie für die Isolierung von HPMEC verwendet und um die Isolierung der Epithelzellen erweitert.

Der Vergleich der in dieser Arbeit etablierten Methode mit einer standardisierten Methode zur Isolierung primärer Lungenepithelzellen nach Murphy und Mitarbeitern (Murphy et al., 1999) zeigte, dass nach eigener Methode das Gewebe stärker dissoziiert war und mehr Epithelzellen sowie Endothelzellen aus dem Gewebsverband herausgelöst wurden. Die etablierte Methode war somit geeignet, möglichst viele Epithel- und Endothelzellen gleichzeitig aus humanem peripherem

Lungengewebe zu isolieren. Die Epithelzellen unterschieden sich in P0 nicht von den nach der Standardmethode (Murphy et al., 1999) isolierten Epithelzellen. In serumfreiem Medium auf Kollagen Typ 1-beschichteten LabTek zeigten 93-95% der Zellen eine Alkalische Phosphatase Aktivität, Lamellar Bodies und waren positiv für die hATII Zell-Marker TTF-1 und SP-C. Auffallend war das Auftreten von zwei morphologisch unterschiedlichen Zellpopulationen in serumfreiem AEGM in P0. In serumfreiem AEGM fanden sich sowohl eine Population flach ausgebreiteter Zellen als auch, zeitlich zunehmend, mehrere Gruppen kuboidaler Zellen, während für das gleiche Isolat in serumhaltigem Medium (SAGM mit 1% FKS) nur eine Zellpopulation flach ausgebreiteter Zellen nachweisbar war.

Serumhaltiges Medium beeinflusst morphologische und biochemische Eigenschaften von ATII Zellen in Kultur. Innerhalb der ersten 2 bis 4 Tage in Medium mit 10% FKS flachen ATII Zellen der Ratte ab, verlieren ihre Mikrovilli (Warburton et al., 1998; Campbell et al., 2003), zeigen weniger surfactant-gefüllte Lamellar Bodies und verändern ihr charakteristisches Phospholipid-Synthesemuster (Cott et al., 1987). Morphologische Veränderungen wurden ebenfalls in SAGM mit einem Serumgehalt von nur 1% FKS für die P0 von hATII Zellen nach 8 bis 10 Tagen in Monokultur auf Filtermembranen beschrieben (Fuchs et al., 2003). Fuchs und Mitarbeiter wiesen zusätzlich eine zeitabhängige Reduktion der Synthese von proSP-C nach, mit einer maximalen Expression von proSP-C an Tag 2-4 und einem Verlust der Expression von proSP-C bei einem Großteil der Zellen nach 8-tägiger Kultivierung. Die Dedifferenzierung der ATII zu ATI-ähnlichen Zellen *in vitro* wird in vielen Publikationen als ein der Transdifferenzierung der ATII Zellen *in vivo* vergleichbarer Vorgang beschrieben (Kawada et al., 1990; Paine et al., 1990; Borok et al., 1995). Der Nachweis von Typ I-spezifischen Markern T1 α (Williams et al., 1996) und RTI40 (Vanderbilt und Dobbs, 1998) auf dedifferenzierten ATII Zellen im Rattenmodell, weist auf eine Transdifferenzierung zu Typ I-ähnlichen Zellen in Kultur hin. Bisher wurden *in vitro* jedoch nie ATI-ähnliche Zellen mit einer vergleichbaren Größe und abgeflachten Morphologie wie die der ATI Zellen *in vitro* erhalten. Daher fehlt manchen Autoren der eindeutige Beweis für einen ATI-Phänotyp der dedifferenzierten ATII Zellen in Kultur (Wise und Lechner, 2002).

Neuere Studien zeigen eine Zunahme der Expression von Caveolin-1 und die Ausbildung von Caveolae bei dedifferenzierten ATII Zellen von Ratte und Mensch in serumhaltigem Medium *in vitro* (Kasper et al., 1998; Campbell et al., 1999; Fuchs et al., 2003). Da *in vivo* nur bei ATI Zellen Caveolae ausgebildet werden, unterstützen diese Studien die Theorie der Transdifferenzierung der ATII Zellen zu Zellen mit einem ATI-Phänotyp *in vitro*. Die beschriebene De- bzw. Transdifferenzierung der hATII Zellen wird durch serumhaltiges Medium gefördert. Die einzelnen Faktoren, die diesen raschen Verlust der ATII-spezifischen Marker auslösen, sind bisher nicht genauer untersucht.

Serumfreies Medium dagegen dient der Aufrechterhaltung des ATII-Phänotyps (Xu et al., 1998; Rice et al., 2002). Auch bei den nach eigener Methode isolierten hATII Zellen blieb in serumfreiem

AEGM die Expression von proSP-C bis zu 9 Tagen in P0 erhalten. Serumfreies Medium unterstützte nicht nur die Aufrechterhaltung des ATII Phänotyps in P0, wie für ATII Zellen der Ratte (Kawada et al., 1990; Paine et al., 1990; Rice et al., 2002) und Maus (Rice et al., 2002) bereits gezeigt wurde, sondern förderte offenbar die Proliferation einer kuboidalen Subpopulation innerhalb der humanen ATII Zellen.

Wegen des raschen Verlusts phänotypischer Merkmale bei ATII Zellen in Kultur, wurden diese von den meisten Wissenschaftlern in P0 verwendet. Die selbst isolierten, serumfrei kultivierten hATII Zellen konnten erfolgreich mit Collagenase/EDTA passagiert und weiter kultiviert werden. Da bisher Eigenschaften von passagierten hATII Zellen nicht untersucht wurden und das Passagieren eine Vermehrung von Subpopulationen der hATII Zellen oder auch von kontaminierenden Zellen begünstigen konnte, wurden die passagierten Zellen als hATII* bezeichnet. Im Verlaufe der Kultur behielten die passagierten hATII* die Eigenschaft zur Synthese von SP-A und SP-D in AEGM bis zu 27 Tagen in Kultur, verloren jedoch schon in P2 die Expression von TTF-1. Auch die *Tight Junction* und *Adherens Junction* assoziierten Proteine E-Cadherin und ZO-1 waren in P2 nur noch ungleichmäßig an den Zell-Zell-Grenzen lokalisiert. Dieser Verlust zelltypspezifischer Marker weist auf die Dedifferenzierung der hATII* durch eine Subkultivierung hin. Obwohl der hATII-Phänotyp in P0 durch serumfreies Medium gefördert wurde, konnte nicht alle Eigenschaften von hATII Zellen in serumfreiem Medium über mehrere Passagen beibehalten werden. Besonders für die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten scheint ein Serumzusatz notwendig.

In P0 traten kontaminierende Fibroblasten nur vereinzelt auf, vermutlich wurde ihr Wachstum von parakrinen Faktoren der Epithelzellen wie zum Beispiel Prostaglandin E2 (Pan et al., 2001; Moore et al., 2003) unterdrückt. Das Passagieren führte zu einem vermehrten Wachstum der kontaminierenden Fibroblasten. Daher musste versucht werden, eine reinere Population von hATII Zellen zu erhalten. Eine homogene fibroblastenfreie Population von Epithelzellen wurde durch die immunomagnetische Separation mit CD44v6-Beads erreicht. Der für die Trennung verwandte Antikörper gegen CD44v6 bindet *in situ* spezifisch an Alveolarepithelzellen vom Typ II bzw. basale Bronchialzellen mehrschichtiger Bronchien und Bronchiolen (Kasper et al., 1995a; Wimmel et al., 2001). Die CD44v6 isolierten hATII* waren direkt nach der Isolation (in P1) positiv für SP-C und TTF-1 (siehe Abb. 19, Seite 77). Die Expression dieser Marker ließ jedoch im Verlaufe der Passagen rasch nach.

Außer dem zelltypspezifischen Vorkommen von CD44v6 *in situ* können Antigene der CD44v-Gruppe bei migratorischen Epithelzellen in Kultur hochreguliert werden, da CD44 an der Zelladhäsion, Migration und der Regulation von Zell-Matrix Interaktionen beteiligt ist. Bei der Embryonalentwicklung der Rattenlunge exprimieren alle bronchialen und alveolären Epithelzellen vom Tag 16 bzw. 21 bis zur Geburt CD44v6 (Weber et al., 1996; Fasano et al., 1997), außerdem wird die Expression von CD44v6 mit einem epithelialen Stammzelltyp in Verbindung gebracht (Weber et al., 1996; Fasano et al., 1997). Aus diesem Grunde ist nicht auszuschließen, dass *in vitro* eine Expression von CD44v6 außer von Typ II Alveolarepithelzellen auch von anderen respiratorischen

Epithelzellen gezeigt werden könnte. Das Vorkommen bronchialer Basalzellen im Isolat ist wenig wahrscheinlich, da die Epithelzellen aus distalem Lungengewebe isoliert wurden. Clarazellen, die als nicht-zilientragende Zellen den epithelialen Übergang der respiratorischen Bronchiolen zu den Alveolen bilden, könnten jedoch im Zellisolat vorhanden sein. Clarazellen und ATII Zellen besitzen viele gemeinsame Marker, wie TTF-1, SP-A, SP-B und SP-D, was die Unterscheidung dieser beiden distalen respiratorischen Epithelzelltypen erschwert. SP-C gilt als ATII spezifisches Surfactantprotein (Kalina et al., 1992). Bei den CD44v6⁺ Zellen wurde SP-C sowohl mittels Immunfluoreszenz als auch in der RT-PCR in der ersten Passage eindeutig nachgewiesen. Im Verlaufe der zweiten und dritten Passagen war SP-C nur bei wenigen Zellen punktiert im Zytoplasma nachweisbar und die mRNA-Expression dieses ATII spezifischen Surfactantproteins ließ ebenfalls deutlich nach, während SP-D unverändert stark produziert wurde. Das Vorkommen von zwei gegenüber Clarazellen für hATII Zellen spezifischen Markern, CD44v6 und SP-C, unterstützt die Annahme, dass die CD44v6⁺ isolierten hATII* humane ATII Zellen sind. Außerdem war der Nachweis des Clarazell-Proteins CC-10 an den CD44v6⁺ Zellen mittels Immunfluoreszenz negativ.

Die Trennung mit CD44v6-Beads löste das Problem der kontaminierenden Fibroblasten, bedingte jedoch eine Passage der hATII Zellen, die mit einem Verlust phänotypischer Merkmale der ATII Zellen einherging. Weitere Merkmale der passagierten CD44v6⁺ Zellen deuten darauf hin, dass der Phänotyp der proliferierenden hATII* Zellen *in vitro* gegenüber dem *in vivo* verändert ist. Eine Population der hATII Zellen zeigte in P0 eine verstärkte Markierung mit Caveolin-1 und die Expression von CK14. CK14 und CD44v6 sind *in situ* als Marker für Basalzellen der Bronchien bekannt. Dies legt die Vermutung nahe, dass sich im Isolat vereinzelt vorkommende bronchiale Basalzellen in serumfreiem AEGM Medium im Verlaufe der weiteren Passagen und der Beads-Trennung durchsetzen. Dagegen spricht der positive Nachweis von Markern von hATII Zellen, wie TTF-1, SP-C und SP-D, bei den CD44v6 isolierten Zellen in P1. Die Expression von CK 14 könnte im Zusammenhang mit einem regenerativen Phänotyp von hATII Zellen stehen, da die CK 14 positiven Zellen *in vitro* auch proliferativ aktiv waren (Ki67 positiv). Bei der Regeneration von trachealem Epithel der Ratte nach mechanischer Verletzung *in vivo* wurden undifferenzierte Zellen mit einer positiven CK 14 Expression beschrieben (Shimizu et al., 1994). Auch in Alveolarepithel kommen CK 14 positive Zellen nach Schädigung der Lunge vor. So wurden *in vivo* bei einer speziellen Form der pulmonalen Fibrose, der idiopathischen pulmonalen Fibrose (IPF), kuboidale metaplastische Zellen mit CK 14 Expression in den Alveolen gefunden, von denen man annahm, dass sie von Basalzellen abstammten (Iyonaga et al., 1997). Diese CK 14 positiven Zellen im Alveolarepithel bei IPF könnten nach den *in vitro* Befunden auch aus einer proliferativ aktiven Subpopulation von hATII Zellen stammen, die CK 14 exprimiert. Auch andere Arbeitsgruppen berichten von einer Subpopulation der Alveolarepithelzellen mit möglichem Stammzellcharakter, die einen Anteil von ca. 5% der Alveolarepithelzellen ausmacht (Driscoll et al., 2000). Diese Zellen exprimieren Telomerase

und sind relativ resistent gegenüber einer durch Hyperoxie ausgelösten Apoptose (Driscoll et al., 2000).

Um den hATII-Ursprung der CD44v6⁺ isolierten Zellen nachzuweisen, wurde versucht eine Redifferenzierung der proliferierenden Zellen zu induzieren. Daher wurde der Einfluss von Serum, der Ko-Kultur mit Endothelzellen und physiologischer Stimuli, wie z.B. des Glukokortikoids Dexamethason, auf die Differenzierung der CD44v6⁺ hATII* in Kultur genauer untersucht.

4.2 Einfluss von Dexamethason und Serum auf die CD44v6 positiven Zellen

Ein Verlust phänotypischer Merkmale von ATII Zellen innerhalb von wenigen Tagen in Kultur wurde von vielen Gruppen beschrieben (Shannon et al., 1987; Bingle et al., 1990). Dabei konnte der ATII Phänotyp *in vitro* durch Variation der Kulturbedingungen, wie Air-Lift Kultur oder Liquid-Air interface (Gueven et al., 1996; Dobbs et al., 1997), Kultivierung auf schwimmenden Kollagengelen (Shannon et al., 1992; Danto et al., 1995) auf Laminin (Rannels et al., 1989; Sannes et al., 1998) oder komplexer extrazellulärer Matrix (Plazentamembran oder MDCK-Matrix) (Alcorn et al., 1997) und durch Medienzusätze wie cAMP und Dexamethason (Gonzales et al., 2002) erhalten werden. In allen genannten Fällen wurde jedoch im Unterschied zur der in dieser Arbeit verwendeten Methode mit Zellen in P0 oder fötalen ATII Zellen gearbeitet.

Die Förderung der Proliferation der hATII Zellen und die durch die Trennung mit CD44v6-Beads notwendige Passage der Primärisolate führte zu einem proliferierenden, wenig differenzierten Phänotyp der hATII*. Der Rückgang der SP-C-Expression, als charakteristischem phänotypischen Marker für ATII Zellen, die nur noch partiell vorhandene Expression von Proteinen, die mit *Adherens Junctions* und *Tight Junctions* assoziiert sind, und die unzureichende Ausbildung zellulärer Kontakte, deuteten auf eine unzureichende Differenzierung der hATII* Zellen unter den bisher gewählten Kulturbedingungen hin. Daher konnte für die passagierten CD44v6⁺ hATII* Zellen wegen des raschen Verlusts phänotypischer Merkmale der hATII-Ursprung nicht eindeutig nachgewiesen werden. Aus diesem Grunde wurde angestrebt, durch Variation der Kulturbedingungen eine Redifferenzierung der proliferierenden hATII* zu induzieren. Dazu wurde der Einfluss von Serum auf die Transdifferenzierung zu ATI-ähnlichen Zellen sowie der Einfluss Glukokortikoids Dexamethason auf die Aufrechterhaltung des ATII-Phänotyps mittels Transmissionselektronenmikroskopie morphologisch untersucht.

Während hATII* in P1 dem für hATII Zellen in P0 beschriebenen, rundlich kuboidalen morphologischen Phänotyp mit apikalen kurzen Mikrovilli und vielen eher apikal gelegenen Lamellar Bodies entsprachen, besaßen hATII* in P2 eher basolateral gelegene vakuolenartige Strukturen mit Resten von lamellären Membranen. Außerdem wurden in P2 in serumfreiem Medium, korrelierend zu der vereinzelt Markierung von ZO-1 und E-Cadherin, wenig Zell-Zell-Kontakte zwischen den benachbarten hATII* Zellen ausgebildet.

Nach Zugabe von 1 µM Dexamethason bildeten die CD44v6⁺ hATII* in P2, unabhängig vom Serumzusatz, kuboidale Monolayer, während sie ohne Dexamethason 2- bis 3-schichtige Zell-Layer

ausgebildet. Mit Dexamethason waren außerdem zahlreiche perinukleäre vakuolenartige Strukturen, die mit lamellären Membranen oder Lipidtröpfchen gefüllt waren, und Multivesikuläre Bodies nachweisbar. Obwohl die Multivesikulären Bodies die für Clarazellen charakteristischen Organellen sind, kommen sie ebenfalls vermehrt bei der Neusynthese von SP-B in ATII Zellen vor (Brasch et al., 2004), was auf eine beginnende Redifferenzierung der hATII* hinweist. Die Zugabe von 1 μ M Dexamethason zu den CD44v6⁺ hATII* in P2 förderte nach den morphologischen Befunden den hATII Phänotyp dieser Zellen.

Mit zunehmendem Serumgehalt im Medium verringerte sich die Länge der apikalen Mikrovilli. Mit 5% FKS waren zwar flacher ausgestreckte Zellen als in serumfreiem Medium nachweisbar, die Zellen enthielten aber noch zahlreiche vakuolenartige Strukturen. Eine Transdifferenzierung zu ATI-ähnlichen Zellen mit Caveolae-Strukturen, wie bei Fuchs und Mitarbeitern in SAGM mit 1% FKS in P0 gezeigt wurde (Fuchs et al., 2003), konnte jedoch für ATII* in P2 in AEGM mit 1% und 5% FKS nicht nachgewiesen werden. Ähnlich den passagierten hATII* Zellen konnte auch bei der Subkultivierung passagierter Bronchialepithelzellen keine Transdifferenzierung mehr beobachtet werden (Wise und Lechner, 2002).

Trotz Zugabe von Dexamethason und Serum war die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten zwischen den benachbarten CD44v6⁺ hATII* in P2 wenig ausgeprägt. Scheinbar sind außer FKS und Dexamethason weitere Faktoren notwendig, damit CD44v6⁺ hATII* in zweiter Passage eine funktionelle Barriere ausbilden. Verschiedener Faktoren, wie Moleküle der extrazellulären Matrix (Adamson et al., 1997; Alcorn et al., 1997), Wachstumsfaktoren wie *keratinocyte growth factor* (Shannon et al., 2001; Mason et al., 2002) oder auch die Ko-Kultur mit benachbarten Zelltypen spielen hier eine Rolle. Ein positiver Effekt auf die Differenzierung zum ATII-Phänotyp wurde bei ATII Zellen der Ratte durch die Ko-Kultivierung mit Fibroblasten beschrieben (Matsui et al., 1999; Sanchez-Esteban et al., 2001; Shannon et al., 2001). Bei Endothelzellen konnte durch die Ko-Kultivierung mit glatten Muskelzellen eine dichtere Barriere induziert werden (Kurzen et al., 2002). In dieser Arbeit durchgeführte Studien zum Einfluss von Endothelzellen auf die Ausbildung eines dichten Layers von CD44v6⁺ hATII* werden in Kapitel 3.11 beschrieben und in Kapitel 4.8 diskutiert.

4.3 Charakterisierung der endothelialen und epithelialen Zell-Linien in Ko-Kulturmedium

Für eine erfolgreiche Ko-Kultur wurden die phänotypischen Eigenschaften der Endothelzell- und Epithelzell-Linien in einem gemeinsames Ko-Kulturmedium untersucht. Da HPMEC wie die endotheliale Zell-Linie ISO-HAS-1 wachstumsfaktorabhängig wachsen, musste ein geeigneter Wachstumsfaktor für die Ko-Kultivierung mit pulmonalen Epithelzellen gefunden werden. Mit bFGF wurde ein Wachstumsfaktor ausgewählt, der sowohl auf die Proliferation als auch auf die Differenzierung beider Zelltypen, Endothelzellen und Epithelzellen, Einfluss zu haben scheint. bFGF kommt in alveolären und vaskulären Basalmembranen der sich entwickelnden Lunge vor (Sannes et al., 1992). Weiterhin hat der Wachstumsfaktor bFGF eine positive Wirkung auf die Differenzierung

von A549 Zellen, indem er die Expression von SP-A steigert (Speirs et al., 1991) und die Bildung von endogener Alkalischer Phosphatase in A549 induziert (McCormick et al., 1995).

ISO-HAS-1 zeigten im Ko-Kulturmedium mit bFGF im Vergleich zu primär isolierten pulmonalen mikrovaskulären Endothelzellen (HPMEC) alle untersuchten Marker von Endothelzellen, wie vWF, PECAM-1, VE-Cadherin, Caveolin-1 und die Ausbildung von Caveolae. Auch das Expressionsmuster von ICAM-1 und E-Selektin nach Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen ähnelte dem der HPMEC (siehe auch Kap. 3.6). In Hinblick auf die untersuchten endothelialen Marker ist ISO-HAS-1 als mikrovaskuläre Zell-Linie für das Ko-Kulturmodell geeignet.

Als epitheliale Zell-Linien wurden A549, NCI H441 und NCI H820 auf Eigenschaften von Typ II Alveolarepithelzellen untersucht. Übereinstimmend mit den Ergebnissen von Winton und Mitarbeiter (Winton et al., 1998), die A549 in DMEM mit 10% hitzeinaktiviertem FKS auf Matrigel-beschichteten Membraneinsätzen (Transwell) kultivieren, zeigte die A549 Zell-Linie eine schwache immunzytochemische Markierung für E-Cadherin. Desweiteren war die perijunktionale Markierung von ZO-1 bei A549 übereinstimmend mit eigenen Experimenten fragmentiert und erreichte nie eine kontinuierliche ringförmige Ausprägung. Eine solch ringförmige Expression von ZO-1 an den apikalen Zellgrenzen konnte dagegen bei den Zell-Linien NCI H441 und NCI H820 gezeigt werden. Wegen des Fehlens funktioneller *Tight Junctions* folgerten Winton und Mitarbeiter (Winton et al., 1998) den Ausschluss der Zell-Linie A549 für Permeationsstudien. Der Einsatz von A549 für Fragestellungen, bei denen ein dichter Epithelzell-Layer eine untergeordnete Rolle spielt, ist weiterhin durchaus interessant, da die A549 Zellen die bisher am besten charakterisierten Zellen mit Eigenschaften von hATII Zellen sind. Sie zeigten immunzytochemisch eine Expression aller vier Surfactantproteine, es konnte jedoch keine nukleäre Expression von TTF-1 nachgewiesen werden. Eine fehlende oder geringe Expression klassischer epithelialer Marker wie E-Cadherin und ZO-1 sowie die geringe Aktivität von Alkalischer Phosphatase als Marker von Typ II Alveolarepithelzellen bei A549 deuten auf eine geringe Differenzierung dieser Zell-Linie in Kultur hin. Diese geringe Differenzierung von A549 wurde auch von anderen Autoren beschrieben (Godfrey, 1997; Krensel und Lichtner, 1999). Verschiedene Faktoren beeinflussen die Differenzierung von A549 Zellen in Kultur. So zeigten Yevdokimova und Freshney (Yevdokimova und Freshney, 1997), die die Aktivität der endogenen Alkalischen Phosphatase als Differenzierungsmarker für A549 einsetzten, einen Einfluss von Heparansulfatproteoglycanen (HSPG's), einem Bestandteil der extrazellulären Matrix, auf die Aktivität der Alkalischen Phosphatase. Außer der extrazellulären Matrix, die einen wichtigen Regulator der zellulären Polarität, der Differenzierung, des Wachstums sowie der Apoptose und Genexpression von Epithelzellen darstellt (Hagios et al., 1998), können parakrine Faktoren, wie Wachstumsfaktoren und Hormone oder auch die Ko-Kultivierung mit benachbarten Zellen, die zelluläre Differenzierung beeinflussen. Daher wurden A549, trotz unzureichender Differenzierung in der Monokultur, für spätere Ko-Kulturexperimente eingesetzt.

NCI H441 und NCI H820 waren, außer für E-Cadherin und ZO-1 als Marker epithelialer Zell-Zell-Kontakte, für alle untersuchten Marker humaner Alveolarepithelzellen vom Typ II, wie Surfactantproteine, TTF-1, Lamellar Bodies und CD44v6 positiv. NCI H441 zeigten jedoch mit der Expression von CC-10 und der Ausbildung multivesikulärer Körperchen (multivesicular bodies = MVB) auch Eigenschaften von Clarazellen. Übereinstimmend mit den eigenen morphologischen Ergebnissen beschrieb eine frühere Studie eine sowohl Clarazell- als auch hATII-ähnliche Ultrastruktur von NCI H441 (Gazdar et al., 1990). In der Literatur werden NCI H441 eher als Clarazell-ähnlich beschrieben (Nord et al., 1998; Cassel et al., 2000; Kulaksiz et al., 2002), der positive Nachweis des ATII-spezifischen Markers SP-C mittels Immunfluoreszenz und RT-PCR bei NCI H441, besonders bei Zugabe von Dexamethason zum Kulturmedium (siehe Kap. 3.4.3.3), unterstreicht jedoch die ebenfalls vorhandene Ähnlichkeit dieser Zell-Linie mit hATII Zellen.

Die Zell-Linie NCI H820 wurde bisher wenig beschrieben. Sie gilt als in Suspensionskultur wachsende Zell-Linie mit hATII-ähnlicher Ultrastruktur (Gazdar et al., 1990). Durch den Einsatz Kollagen Typ I-beschichteter Kulturoberflächen gelang es, adhärent wachsende NCI H820 zu kultivieren. Wie für die Suspensionskultur beschrieben (Gazdar et al., 1990; Whitsett et al., 1992), zeigten auch diese adhärent wachsenden NCI H820 in serumfreiem Medium (DHSF) viele Lamellar Bodies und die Expression von SP-A, SP-B, SP-C, SP-D und TTF-1. In serumhaltigem Medium war mittels Immunfluoreszenz die Markierung der Surfactantproteine SP-A, SP-B und SP-C gegenüber der Kultivierung in serumfreiem Medium reduziert. Dieses Verhalten erinnert an eine Dedifferenzierung von primär isolierten hATII Zellen in serumhaltigem Medium. Ob NCI H820 nur ATII-Marker verlieren oder auch ATI-Marker entwickeln, also transdifferenzieren, müsste in weiteren Studien durch den morphologischen Nachweis von Caveolae oder ATI-Markern wie RAGE gezeigt werden. Sowohl in DHSF als auch in serumhaltigem Ko-Kulturmedium bildeten NCI H820 als adhärent wachsende Monolayer gut ausgeprägte Zell-Zell-Kontakte aus. Eine Ausbildung von *Tight* und *Adherens Junctions* ist bisher für NCI H820 von anderen Arbeitsgruppen nicht beschrieben worden.

4.4 Einfluss von Dexamethason auf die Eigenschaften von A549, NCI H441 und NCI H820

Dexamethason spielt eine Rolle bei der parakrinen Kontrolle der zellulären Differenzierung von Lungenepithelzellen. So konnte der Einsatz von Dexamethason in konditioniertem Medium bei A549 eine Steigerung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase hervorrufen (Yevdokimova und Freshney, 1997). Außerdem förderte serumfreies Medium mit Dexamethason und cAMP die Erhaltung des ATII Phänotyps bei humanen fötalen ATII Zellen (Gonzales et al., 2002) und aus Ratten isolierten ATII Zellen (Bates et al., 2002). Für die Zell-Linie NCI H441 ist ein weiterer Effekt von Dexamethason bekannt, nämlich die Hochregulierung der α - und β -Untereinheit des epithelialen Natrium-Kanals ENaC (Sayegh et al., 1999; Dagenais et al., 2001; Itani et al., 2002; Ramminger et al., 2004).

Bei A549 (Greenberg et al., 2002) und alveolaren Epithelzellen (Corroyer et al., 1997) hatte Dexamethason eine hemmende Wirkung auf die Proliferation. Von den untersuchten epithelialen Zell-

Linien wuchsen nur NCI H820 Zellen im Ko-Kulturmedium kontakthinhibiert mit Zellzahlen von maximal $1,5 \times 10^5$ Zellen/cm² bei einer Kulturdauer von 14 Tagen. Die Zell-Linie NCI H441 erreichte nach 14 Tagen Zellzahlen von $4,42 \times 10^5$ Zellen/cm². Durch Zugabe von $1 \mu\text{M}$ Dexamethason zum Kulturmedium wurde eine Inhibition des Wachstums der NCI H441 mit Zellzahlen von $1,5\text{-}2 \times 10^5$ Zellen/cm² bei einer Kulturdauer von 14 Tagen erreicht.

Dexamethason beeinflusst weiterhin die Freisetzung von Wachstumsfaktoren und die Produktion von Surfactant Proteinen. So konnte die Expression von SP-A (Boggaram et al., 1989), SP-B und SP-C (Venkatesh et al., 1993) in humaner fötaler Lunge durch Dexamethason erhöht werden. Bei den Zell-Linien A549 und NCI H441 wurde die SP-C Expression gesteigert, wie mittels PCR gezeigt werden konnte (siehe Abb. 34, Seite 95). Die für die Zell-Linie NCI H820 gezeigte Induktion der Synthese von SP-A, SP-B und SP-C mRNA durch Konzentrationen von 10^{-9} - 10^{-7} M Dexamethason in serumfreiem Medium (Gazdar et al., 1990) konnte jedoch in eigenen Versuchen nach Behandlung mit $1 \mu\text{M}$ Dexamethason mittels RT-PCR nicht gezeigt werden. Bei ATII aus humaner fötaler Lunge war die Erhöhung von SP-A konzentrationsabhängig. So konnte Dexamethason von 10^{-10} M bis 10^{-9} M die Expression von SP-A stimulieren, 10^{-7} M ($0,1 \mu\text{M}$) Dexamethason hemmte jedoch die mRNA Level von SP-A (Boggaram et al., 1989). Die fehlende Induktion der SP-C mRNA bei NCI H820 könnte demnach ebenfalls einem Konzentrationseffekt von Dexamethason zugrunde liegen. Außer der Induktion der Synthese von Surfactantproteinen reduziert Dexamethason die Freisetzung von VEGF bei NCI H441 und NCI H820 (siehe Abb. 33, S. 94).

Außer den genannten spezifischen Effekten auf respiratorische Epithelzellen hat Dexamethason eine allgemeine anti-inflammatorische, immunsuppressive Wirkung. Dieser Effekt beruht auf einem transkriptionshemmenden Effekt des durch Dexamethason aktivierten humanen Glukokortikoidrezeptors (hGR). Der Glukokortikoidrezeptor bindet an den Transkriptionsfaktor NF- κ B, der durch inflammatorische Stimuli wie Zytokine, Phorbolster, bakterielles LPS oder verschiedene Stressoren, wie H₂O₂ und UV-Strahlung aktiviert wird, und hemmt wiederum dessen Bindung an die regulatorischen Sequenzen seiner Zielgene. Der Vergleich der stimulationsinduzierten Freisetzung von Zytokinen bei unbehandelten und mit $1 \mu\text{M}$ Dexamethason behandelten NCI H441 und NCI H820 zeigte, dass nach Dexamethason-Behandlung die Zytokine in geringerer Menge ausgeschüttet wurden, wobei besonders die TNF- α stimulierte Zytokinfreisetzung auf ca. $1/3\text{-}1/5$ reduziert war (siehe Kap.3.5.2). Durch die Behandlung mit $1 \mu\text{M}$ Dexamethason blieb jedoch die Sekretion von keinem der untersuchten Zytokine nach Stimulation ganz aus.

Die positiven Effekte auf die Proliferation und die Surfactantproduktion der NCI H441, die reduzierte VEGF-Freisetzung bei NCI H441 und NCI H820 sowie die Ausbildung funktioneller *Tight Junctions*, die auch für Mamma-Epithelzellen (Buse et al., 1995) beschrieben ist, machten Dexamethason zu einem wichtigen parakrinen Faktor für die Differenzierung der epithelialen und endothelialen Zellen in dem zu etablierenden Ko-Kulturmodell.

4.5 Vergleichende Untersuchung der Epithelzellen in Mono-Kultur: CAM-Expression und Freisetzung sekundärer inflammatorischer Mediatoren

Die meisten Studien zur CAM und Zytokin-Expression humaner ATII Zellen sind an der Zell-Linie A549 durchgeführt worden oder an ATII Zellen der Ratte untersucht. An primär isolierten hATII Zellen sind bisher wenige Studien zu deren inflammatorischen Verhalten durchgeführt worden (Cunningham und Kirby, 1995; Pechkovsky et al., 2000; Rosseau et al., 2000).

Inflammatorische Mediatoren von A549 Zellen im Vergleich zu primär isolierten ATII

Die für A549 durch Stimulation mit TNF- α und IL-1 β gezeigte Expression von ICAM-1, IL-8, IL-6, MCP-1 und RANTES (Rosseau et al., 2000) konnte in unseren Experimenten bestätigt werden. Eine 10fache Steigerung ICAM-1 Expression nach einer Stimulation von A549 Zellen mit 10 ng/ml TNF- α für 24 h (Burke-Gaffney und Hellewell, 1996) war vergleichbar mit eigenen Ergebnissen. Im CAM-EIA konnte für A549 keine signifikante VCAM-1 Expression nachgewiesen werden, während eine Expression von VCAM-1 mRNA durch Stimulation mit TNF- α (6h) mittels RT-PCR gezeigt wurde. Zur Expression von VCAM-1 bei Alveolarepithelzellen gibt es derzeit wenige Studien. Eine mögliche VCAM-1 Expression wird kontrovers diskutiert und ist bisher nur für Zellkulturen beschrieben. A549 zeigten in unseren Experimenten deutliche Unterschiede zu primär isolierten hATII Zellen in Kultur und zu den Zell-Linien NCI H441 und NCI H820, bei denen keine Induktion von VCAM-1 durch Stimulation mit den „early response“ Zytokinen TNF- α (300 U/ml) und IL-1 β (100 U/ml) induziert wurde. Diese Befunde stimmen mit anderen Studien überein, bei denen VCAM-1 bei A549 durch TNF- α (Rosseau et al., 2000) und Toxine (Pelletier et al., 2002) induziert wurde, während isolierte humane Alveolarepithelzellen vom Typ II weder basal (Cunningham und Kirby, 1995) noch nach Stimulation mit TNF- α eine VCAM-1-Expression zeigten (Rosseau et al., 2000).

Bei hATII Zellen in zweiter Passage (P2) und hATII Zellen (P0) nach 8 Tagen in Ko-Kultur mit HPMEC (siehe Kap. 3.12.3.3) wurden weder VCAM-1 bzw. sVCAM-1 noch RANTES nach Stimulation mit TNF- α (300 U/ml) nachgewiesen. Entgegen eigenen Ergebnissen wurde bei transdifferenzierten humanen Typ I-ähnlichen Alveolarepithelzellen (Rosseau et al., 2000) sowie in 2 von 6 Isolaten von 3-4 Tage alten humanen ATII Zellen in P0 (Witherden et al., 2004) eine geringe basale Expression von RANTES beschrieben. Da RANTES nur in einigen hATII Isolaten nachweisbar war, wurde von Witherden und Mitarbeitern angenommen, dass RANTES bei normaler Lungenhomöostase in hATII Zellen nicht vorkommt (Witherden et al., 2004). Außerdem wurden die von Witherden und Mitarbeitern isolierten hATII Zellen direkt nach Isolation für Versuche eingesetzt und nicht weiter aufgereinigt. Hier könnten schon wenige im Isolat vorkommende kontaminierende Bronchialepithelzellen oder auch Endothelzellen für die gemessene Freisetzung von RANTES verantwortlich sein.

Eine Freisetzung von RANTES wird innerhalb der pulmonalen Epithelzellen eher von bronchialen Epithelzellen gezeigt (Stellato et al., 1995; Matsukura et al., 1998). Obwohl die Zell-Linie A549 allgemein als ATII ähnliche Zell-Linie eingesetzt wird, weisen immer mehr Publikationen darauf hin,

dass A549 Zellen biochemische Eigenschaften besitzen, die eher einem bronchialen Phänotyp und weniger den Charakteristika humaner Alveolarepithelzellen vom Typ II entsprechen (Mason und Williams, 1980; Balis et al., 1984; Dempo et al., 1987; Berger et al., 1999; Pechkovsky et al., 2000; Pechkovsky et al., 2002). Nach eigenen Ergebnissen für hATII Zellen in zweiter Passage (P2) und primär isolierten hATII Zellen (P0) nach 8 Tagen in Ko-Kultur mit HPMEC (siehe Kap. 3.12.3.3) sind VCAM-1 und RANTES keine von hATII Zellen produzierten inflammatorischen Mediatoren. Die Freisetzung von RANTES bei A549 weist daher ebenfalls auf einen eher bronchialen Phänotyp der A549 hin.

Inflammatorische Mediatoren bei NCI H441

Gegenüber A549 weist die Zell-Linie NCI H441 eher den hATII* Zellen ähnliche als dem bronchialen Phänotyp ähnliche immunmodulatorische Eigenschaften auf. Im Gegensatz zu primären hATII Zellen ließen sich NCI H441 jedoch nicht mit IL-1 β einer Konzentration von 100 U/ml stimulieren. Diese Konzentration von IL-1 β hatte ebenfalls bei nur 3 von 7 Spendern einen stimulierende Effekt auf die ICAM-1-Expression von CD44v6⁺ hATII* Zellen. Daher könnte eine zur Stimulation noch nicht optimale Konzentration des Zytokins oder auch eine individuelle Sensibilität auf eine Stimulation mit IL-1 β der Grund für die fehlende Reaktion der Zell-Linie NCI H441 auf IL-1 β sein. Dazu sind derzeit keine Untersuchungen publiziert. Diese Fragestellung müsste mit verschiedenen Konzentrationen von IL-1 β in weiteren Versuchen untersucht werden. TNF- α in einer Konzentration von 300 U/ml löste die Freisetzung der sekundären inflammatorischen Mediatoren IL-8 und MCP-1 bei NCI H441 aus. Die basale Freisetzung von IL-6 wurde jedoch nicht durch 300 U/ml TNF- α gesteigert.

Inflammatorische Mediatoren bei NCI H820

Im Unterschied zu den selbst isolierten CD44v6⁺ hATII* in P2, die nach Stimulation nur wenig MCP-1 freisetzen, wurde die Freisetzung des CC-Chemokins MCP-1 bei NCI H820 deutlich durch TNF- α , LPS und IL-1 β hochreguliert. Auch bei ATII Zellen der Ratte, die auf Filtermembranen einen dichten Monolayer bildeten, konnte eine apikale Sekretion von MCP-1 nach Stimulation mit IL-1 β und LPS mittels ELISA gemessen werden (Paine et al., 1993). Die im Rahmen der vergleichenden Studien in P2 eingesetzten hATII* Zellen könnten, außer einer reduzierten Expression von SP-C, weitere biochemische Eigenschaften im Verlaufe der Kultivierung verloren haben. So zeigten in einer neueren Studie 3-4 Tage alte primär isolierte hATII Zellen in P0 (Witherden et al., 2004) nach Stimulation mit einem Zytomix aus E.coli LPS (10 μ g/ml), IFN- γ (100 U/ml), IL-1 β (10 ng/ml) und TNF- α (10 ng/ml) ebenfalls eine Freisetzung von MCP-1, die deutlich höher war als die der CD44v6⁺ hATII* in P2. Witherden und Mitarbeiter (Witherden et al., 2004), die ihre primär isolierten hATII Zellen in P0 ähnlich eigenen Experimenten auf Kollagen Typ I-beschichteten 96-Well Platten kultivierten, fanden eine basale Expression von MCP-1 bei im Mittel 2850 pg/ml (790-4710, n=6) und 9940 pg/ml (6530-15750 pg/ml) nach Stimulation für 24h. In diese Höhe wurde MCP-1 nur durch

Stimulation mit IL-1 β bei den Zell-Linien A549 und NCI H820 produziert. Die CD44v6⁺ hATII* in P2 produzierten nur eine maximale Menge von 476 \pm 142 pg/ml (=149 \pm 44 pg/cm²) MCP-1 nach Stimulation mit IL-1 β . Sollte MCP-1 einen wichtigen chemotaktischen Faktor der hATII Zellen bzw. der hATI-ähnlichen Zellen zur Anlockung mononukleärer Zellen darstellen, so kommt die Zell-Linie NCI H820 in der Freisetzung der untersuchten sekundären Immunmediatoren dem hATII bzw. einem hATI-ähnlichen Phänotyp am nächsten.

NCI H820 scheinen in vielen Eigenschaften mit primär isolierten hATII Zellen bzw. zu hATI-ähnlichen Zellen transdifferenzierten hATII Zellen übereinzustimmen. Für die primär isolierten hATII Zellen müsste der Phänotyp zeitlich noch genauer definiert werden, um die Freisetzung sekundärer inflammatorischer Mediatoren exakt einem hATII- oder hATI-Phänotyp zuordnen zu können. Das Vorkommen intermediärer Formen von hATII und hATI-ähnlichen Zellen erschwert die genaue Zuordnung einer Zytokinfreisetzung zu einem bestimmten Phänotyp der alveolären Epithelzellen. Vielleicht wäre dazu eine *in vivo* Studie aufschlussreicher, da *in situ* differenzierte hATII und hATI Zellen eindeutig morphologisch lokalisiert werden könnten.

ICAM-1 als inflammatorischer Mediator und Differenzierungsmarker für ATI Zellen

Die Synthese des Zelladhäsionsmoleküls ICAM-1 wird für hATII und hATI Zellen kontrovers diskutiert. In normalem nicht entzündlichem Lungengewebe wird ICAM-1 auf der apikalen Oberfläche von Typ I Alveolarepithelzellen exprimiert, auf der Zelloberfläche von Typ II Alveolarepithelzellen ist wenig oder kein ICAM-1 nachweisbar (Kang et al., 1993; Burns et al., 1994; Kasper et al., 1995b; Feuerhake et al., 1998b). *In vitro* Studien an Primärkulturen von Alveolarepithelzellen der Ratte wiesen darauf hin, dass eine hohe ICAM-1 Expression die Haupteigenschaft des Phänotyps von Typ I Alveolarepithelzellen darstellt. Kulturbedingungen, die eine Ausbildung des ATI-ähnlichen Phänotyps fördern, steigern die Expression von ICAM-1, demgegenüber unterdrücken Kulturbedingungen, die den zellulären Phänotyp in Richtung ATII Zelle begünstigen, die ICAM-1 Expression (Christensen et al., 1993; Paine et al., 1994). Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen wurde in eigenen Experimenten die basale Expression von ICAM-1 bei ATII* durch Zugabe von Serum zum Medium gesteigert, eine Kulturbedingung die die Ausbildung eines ATI-ähnlichen Phänotyps fördert.

Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* Studien zeigten bei ATI Zellen eine geringe Veränderung der ICAM-1 Expression nach inflammatorischer Stimulation, während diese auf ATII Zellen rasch induziert wurde (Kang et al., 1993; Burns et al., 1994; Barton et al., 1995). Die Funktion dieser konstitutiven ICAM-1 Expression bei Alveolarepithelzellen vom Typ I wurde bisher noch nicht untersucht, wahrscheinlich wird die Beweglichkeit und Aktivität der Phagozyten im Alveolarlumen unterstützt (Barton et al., 1995; Cunningham und Kirby, 1995). Eine Expression von ICAM-1 wurde ebenfalls an frisch isolierten humanen ATII und in Kultur nachgewiesen (Cunningham und Kirby, 1995). In dieser Studie konnte das proinflammatorische Zytokin Interferon-gamma (IFN- γ) ICAM-1 hochregulieren, während TNF- α und IL-1 β nur geringen Einfluss auf die Expression dieser

Oberflächenmoleküle bei hATII Zellen zeigten (Cunningham und Kirby, 1995). Übereinstimmend mit der genannten Studie wurde in eigenen Experimenten eine geringe basale Expression von ICAM-1 bei serumfrei kultivierten hATII* in P2 nachgewiesen. Sie ließ sich jedoch im Gegensatz zur Studie von Cunningham und Mitarbeitern (Cunningham und Kirby, 1995) bei allen untersuchten hATII* Isolaten mit TNF- α und bei der Hälfte der Isolate mit IL-1 β signifikant steigern. Auch im Maus- und Rattenmodell wurde eine positive Stimulation der ICAM-1 Expression durch TNF- α und IFN- γ *in vivo* (Kang et al., 1996) und *in vitro* (Barton et al., 1995) nachgewiesen.

Erhöhte ICAM-1 Expression bei Zell-Linien

Bei Adenokarzinomen der Lunge wird häufig eine erhöhte Expression von ICAM-1 beobachtet (Jiang et al., 1998), wie sie auch bei NCI H441 und NCI H820 gezeigt wurde. Diese erhöhte Expression von ICAM-1 in pulmonalen Adenokarzinomen mag eine unterstützende Funktion bei der Bindung LFA-1 (Lymphozytenfunktion-Antigen-1)-tragender Lymphozyten wahrnehmen und möglicherweise einen Einfluss auf die verringerte Verletzbarkeit der Tumorzellen und nachfolgende Abwehrmechanismen haben (Jiang et al., 1998).

Zusammenfassend ließ sich zeigen, dass die epitheliale Zell-Linie NCI H441 und NCI H820 im Hinblick auf die untersuchten sekundären Immunmediatoren als Epithelzell-Linien für das zu etablierende Ko-Kulturmodell geeignet sind. Bis auf die hohe konstitutive Expression von ICAM-1 und die fehlende Steigerung der IL-6 Sekretion durch TNF- α (300 U/ml) sind NCI H441 den humanen Alveolarepithelzellen vom Typ II in vielen Eigenschaften ähnlich. IL-1 β in einer Konzentration von 100 U/ml konnte NCI H441 Zellen nicht aktivieren, während es bei der epithelialen Zell-Linie NCI H820 eine gegenüber der unstimulierten Kontrolle 6-10fach erhöhte Freisetzung der sekundären Immunmediatoren IL-6, IL-8 und MCP-1 auslöste. Die Sensitivität auf eine Stimulation mit IL-1 β scheint spenderspezifisch zu sein, da 100 U/ml IL-1 β auch nur bei 3 von 7 Spendern einen stimulierende Effekt auf die CD44v6⁺ hATII* Zellen zeigten.

Unstimulierte A549 Zellen exprimierten kein ICAM-1. Weiter wurden sie durch die eingesetzten Stimulanzien übereinstimmend mit der Literatur zur Expression von VCAM-1, IL-6, IL-8, MCP-1 und RANTES aktiviert (Godding et al., 1995; Pechkovsky et al., 2000; Rosseau et al., 2000; Krakauer, 2002; Lee et al., 2004). Die Expression von VCAM-1 und RANTES, die von CD44v6⁺ hATII* Zellen und von hATII Zellen der primären Ko-Kultur (siehe Kap. 3.12.3.4) nicht gezeigt wurde, deutet auf den bronchiolären Charakter der A549 hin und schließt nach den Ergebnissen dieser Arbeit A549 für immunmodulatorische Studien am ATII-Phänotyp aus.

Die erhöhte ICAM-1 Expression der epithelialen Zell-Linien NCI H441 und NCI H820 stellt für das zu etablierende Ko-Kulturmodell der alveolo-kapillären Einheit nicht zwangsläufig ein Problem dar, da in normalem nicht entzündlichem Lungengewebe ICAM-1 auf der apikalen Oberfläche von Typ I Alveolarepithelzellen exprimiert wird (Kang et al., 1993; Burns et al., 1994; Kasper et al.,

1995b; Feuerhake et al., 1998b) und somit physiologisch eine erhöhte ICAM-1-Expression im Alveolarlumen vorliegt.

4.6 Vergleichende Untersuchung der Endothelzellen in Mono-Kultur: CAM-Expression und Freisetzung sekundärer inflammatorischer Mediatoren

Die Anlockung von zirkulierenden Leukozyten zum Ort der Entzündung hängt sowohl von der Aktivierung der Leukozyten als auch der Aktivierung der Endothelzellen ab. Endothelzellen reagieren als Antwort auf proinflammatorische Zytokine mit der Expression von ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin und sekundären Immunmediatoren, wie IL-6, IL-8, MCP-1 und RANTES. Dabei unterscheiden sich die sekundären Immunantworten der Endothelzellen in Abhängigkeit vom Gewebe und dem Gefäßtyp (Petzelbauer et al., 1993; Brown et al., 1994; Garlanda und Dejana, 1997; Goebeler et al., 1997; Hillyer et al., 2003).

Die mikrovaskuläre Endothelzell-Linie ISO-HAS-1 eignet sich hinsichtlich der Expressionsmuster von ICAM-1 und E-Selektin als Zell-Linie mit Eigenschaften mikrovaskulärer Endothelzellen. Die Expression von VCAM-1 war bei ISO-HAS-1 jedoch wesentlich schwächer als bei HPMEC. Obwohl eine Expression von VCAM-1 mRNA und deren Erhöhung nach 6-stündiger Stimulation mit TNF- α mittels RT-PCR nachgewiesen wurde, wurde mittels Immunmarkierung kaum eine Proteinexpression gemessen. Auch HPMEC zeigten individuelle Schwankungen in der Höhe der Expression von VCAM-1. Dies mag mit der Zusammensetzung der HPMEC aus unterschiedlichen Anteilen arteriolärer, venolärer und kapillärer Zellen, die im Gesamten als mikrovaskuläre Zellen bezeichnet werden, zusammenhängen. Bei einer histologischen Untersuchung von ARDS-Patienten zeigten die kapillären Endothelzellen der Alveolarsepten *in situ* keine Markierung mit anti-VCAM-1 (Feuerhake et al., 1998a; Muller et al., 2002), während die prä- und postkapillären Endothelzellen sowie die arteriolären und venolären Endothelzellen deutlich markiert wurden. ISO-HAS-1 könnten demnach, die Expression von VCAM-1 betreffend, einen eher kapillären Phänotyp der Mikrovaskulatur darstellen.

Ähnlich wie bei einer vergleichenden Studie von humanen mikrovaskulären Endothelzellen der Lunge mit HUVEC (Beck et al., 1999) induzierten TNF- α , IL-1 β und LPS bei den untersuchten HPMEC die Freisetzung von IL-6, IL-8, MCP-1 und RANTES. Dabei wurden bei HPMEC durch LPS-Zugabe (1 μ g/ml) maximal stimuliert. TNF- α (300 U/ml) löste die nächst höhere Freisetzung von IL-6 und RANTES aus, während IL-1 β (100 U/ml) der potentere Stimulator für eine Sekretion von MCP-1 und IL-8 war. Sowohl bei HPMEC als auch bei ISO-HAS-1 wurde durch Stimulation mit 100 U/ml IL-1 β kein RANTES freigesetzt.

Stimulierte ISO-HAS-1 und HPMEC zeigten, bis auf die geringe Aktivierung der ISO-HAS-1 durch 100 U/ml IL-1 β , ein ähnliches Expressionsmuster der Zytokine IL-6 und IL-8. Die Freisetzung des Chemokins MCP-1 ließ sich auch bei ISO-HAS-1 durch 100 U/ml IL-1 β deutlich induzieren. Die von ISO-HAS-1 produzierte Menge an MCP-1 war jedoch wesentlich niedriger als die der primär isolierten HPMEC, was auf eine noch nicht optimale Konzentration von IL-1 β zur maximalen

Aktivierung der ISO-HAS-1 hinweist. Allgemein reagierten HPMEC mit einer wesentlich höheren Freisetzung von Zytokinen als ISO-HAS-1. Die Freisetzung von IL-6 und IL-8 war bei HPMEC nach 24 Stunden gegenüber ISO-HAS-1 von 2fach bis 6fach erhöht, bei MCP-1 und RANTES lag sie ca. 2fach höher. Im Hinblick auf die untersuchten sekundären Immunmediatoren sind ISO-HAS-1 als mikrovaskuläre Endothelzell-Linie für das zu etablierende Ko-Kulturmodell geeignet.

4.7 Etablierung einer funktionellen Barriere: Ko-Kulturen von Epithelzell-Linien (A549/H441) mit ISO-HAS-1 und HPMEC

Für die Ko-Kultur von Alveolarepithelzellen von Typ II und mikrovaskuläre Endothelzellen als Modell einer distalen respiratorischen Einheit war die Differenzierung der beteiligten Zellen eine wichtige Voraussetzung. Wie *in vivo* sollten die beiden Zelltypen in direktem Kontakt stehen und neben wichtigen zelltypspezifischen Markern einen einschichtigen Zell-Layer (Monolayer) ausbilden. Ein Kriterium für die Differenzierung war der Aufbau einer möglichst intakten Zellschicht von epithelialen sowie endothelialen Zellen mit ausgeprägten Zell-Zell-Kontakten, die Ausbildung einer intakten Barriere. Die Ausbildung einer dichten epithelialen Barriere lässt sich über die Messung des TER-Wertes bestimmen. Der TER-Wert korreliert mit der Integrität der Zell-Zell-Kontakte und spiegelt sich vermutlich in den ausgebildeten *Tight Junction* Strängen wieder (Gumbiner, 1987; Stuart und Nigam, 1995; Schneeberger und Lynch, 2004). Da in Primärkultur die De- bzw. Transdifferenzierung der hATII Zellen bereits nach wenigen Tagen in serumhaltigem Medium beginnt, ist es zeitlich schwer zu definieren, ab wann sich die Kultur von hATII Zellen zu einer Mischkultur von hATII und hATI-ähnlichen Zellen verändert. *In vitro* wurden für 3-4 Tage kultivierte ATII Zellen der Ratte TER-Werte von $762 \pm 91 \Omega \times \text{cm}^2$ ermittelt (Dagenais et al., 2001). Für primär isolierte humane Typ II Alveolarepithelzellen, die mehr als 8 Tage kultiviert wurden und teils zu Typ I Alveolarepithelzellen transdifferenzierten, werden TER-Werte von $> 1000 \Omega \times \text{cm}^2$ beschrieben (Elbert et al., 1999; Fuchs et al., 2003). Zu Typ I-ähnlichen Zellen transdifferenzierte Typ II Alveolarepithelzellen der Ratte zeigten TER-Werte $> 2000 \Omega \times \text{cm}^2$ (Kim und Malik, 2003). Diese Mischkulturen von ATII und hATI-ähnlichen Zellen spiegeln wahrscheinlich die *in vivo*-Situation am nächsten wieder, da hier das alveoläre Epithel aus ATII und ATI Zellen besteht. TER-Werte für die alveolo-kapilläre Barriere können wegen des komplexen Aufbaus der Lunge *in vivo* nicht ermittelt werden. Die Dichte dieser Einheit kann *in vivo* nur indirekt über den Transport verschiedenster Moleküle, wie Albumin, Dextranen und Natrium-Fluoreszein, in die Blutbahn untersucht werden (Bayat et al., 2000a; Bayat et al., 2000b; Welsh et al., 2001; Kim und Malik, 2003; Mehta et al., 2004). Bisher sind für Primärzellen in Ko-Kultur keine TER-Werte bekannt. Ko-Kulturen von Endothelzellen mit der Zell-Linie A549, die einen ATII-ähnlichen Phänotyp besitzen, wurden nur aufgrund des reduzierten Transports von Albumin bzw. Dextranen als intakte Bilayer beschrieben, TER-Werte wurden nicht gezeigt (Carolan et al., 1997; Birkness et al., 1999; Casale und Carolan, 1999; Hu et al., 2005).

Einfluss der Ko-Kultur mit Endothelzellen auf den TER-Wert

Die niedrigen TER-Werte ($<100 \Omega \times \text{cm}^2$), die in eigenen Experimenten für Mono-Kulturen der ATII-ähnlichen Zell-Linien A459 und NCI H441 ermittelt wurden, wiesen auf eine unzureichende Differenzierung im Hinblick auf die Ausbildung von *Tight Junctions* in Kultur hin. Die Zell-Linie NCI H820, die in serumhaltigem Medium kontakthinhibiert wuchs, bildete dagegen in Mono-Kultur TER-Werte von $1038 \pm 149 \Omega \times \text{cm}^2$, die denen der ATI-ähnlichen Zellen in Mono-Kultur nahe kamen.

Auch die Ko-Kultur der epithelialen Zell-Linie NCI H441 und A549 mit mikrovaskulären Endothelzellen (ISO-HAS-1 und HPMEC) führte zu keiner deutlichen Steigerung der TER-Werte bei A459 und NCI H441. Desweiteren zeigten die Endothelzellen, besonders die ISO-HAS-1, in Ko-Kultur mit den epithelialen Zell-Linien ein netzartiges Wachstumsmuster. In Mono-Kultur konnte eine Verschiebung des netzartigen Wachstumsmuster der ISO-HAS-1 zu einer pflastersteinartigen morphologischen Phänotyp durch Kultivierung in serumfreiem MCDB 131 mit dem Serumersatz ITS⁺ erreicht werden. In serumfreiem Medium (MCDB 131 mit dem Serumersatz ITS⁺) war in Ko-Kultur jedoch kein nennenswerter TER-Wert messbar. Das netzartige Wachstumsmuster der Endothelzellen in Ko-Kultur beruhte wahrscheinlich auf der Freisetzung parakriner Faktoren der Epithelzellen, die eine angiogene Aktivierung der Epithelzellen induzierten.

Einfluss von Dexamethason auf die Ausbildung differenzierter Monolayer in Ko-Kultur

Wie für A549 bereits beschrieben wurde (Koyama et al., 2002), produzierten auch NCI H441 und NCI H820 Zellen den angiogenen Wachstumsfaktor VEGF (siehe Kap.3.4.3). Dieser parakrine Faktor könnte für die angiogene Aktivierung und das daraus resultierende netzartige Wachstumsmuster der Endothelzellen in Ko-Kultur verantwortlich sein. Es konnte gezeigt werden, dass das Glukokortikoid Dexamethason die Expression von VEGF bei NCI H441 und NCI H820 reduziert. Durch Zugabe von $1 \mu\text{M}$ Dexamethason wurde die Freisetzung von VEGF bei Mono-Kulturen von NCI H441 von $30,8 \text{ ng/ml}$ auf $1,99 \text{ ng/ml}$ und bei NCI H820 von $2,95 \text{ ng/ml}$ auf $1,45 \text{ ng/ml}$ reduziert. Damit wurde ein wichtiger parakriner Faktor, der für eine angiogene Aktivierung der Endothelzellen in Ko-Kultur verantwortlich sein könnte, durch die Zugabe von Dexamethason reduziert.

Außer der Reduktion der VEGF-Freisetzung zeigt Dexamethason wie für A549 (Greenberg et al., 2002) und alveolare Epithelzellen (Corroyer et al., 1997) bereits gezeigt, in eigenen Experimenten eine wachstumshemmende Wirkung auf die Zell-Linie NCI H441. Desweiteren wirkten Glukokortikoide positiv auf die Differenzierung fötaler Alveolarepithelzellen vom Typ II (Gonzales et al., 2002) und unterstützten die Ausbildung von *Tight Junctions* bei Mamma-Epithelzellen (Zettl et al., 1992) sowie bei verschiedenen Endothelzelltypen (Buse et al., 1995; Hoheisel et al., 1998; Underwood et al., 1999; Antonetti et al., 2002). Daher wurde die Wirkung des Glukokortikoids Dexamethason auf die Induktion funktioneller *Tight Junctions* mittels TER-Messung, Immunfluoreszenz und Elektronenmikroskopie an Mono-Kulturen von A549, NCI H441 und NCI H820 sowie Ko-Kulturen der drei Epithelzell-Linien mit ISO-HAS-1 und HPMEC überprüft.

A549 zeigten im Hinblick auf die Ausbildung einer funktionellen Barriere keine ausreichende Differenzierung, wie schon in vorangegangenen Publikationen beschrieben wurde (Godfrey, 1997; Foster et al., 1998; Winton et al., 1998). Auch unter verschiedenen Kulturbedingungen mit Variablen, wie Serumgehalt, komplexe Matrix, Ko-Kultur mit ISO-HAS-1 oder HPMEC wurden keine intakten zellulären Junctionen aufgebaut. Bei der Bilayer-Ko-Kultur mit ISO-HAS-1 oder HPMEC konnte in MCDB 131, 5% FKS, bFGF (2,5 ng) und Heparin (10 µg/ml) durch Supplementierung mit 1 µM Dexamethason ab Tag 3 der Ko-Kultur ein über 10-13 Tage stabiler ein- bis zweischichtiger Layer von A549 generiert werden. Dieser wies jedoch mit ca. 37 Ω x cm² keine nennenswerten Barriere-Eigenschaften auf. Bisher beschriebene Ko-Kulturmodelle von A549 mit HUVEC (Carolan et al., 1997) oder einer endothelialen Zell-Linie (Birkness et al., 1999) wurden zwar für die Untersuchung einer Leukozytenmigration durch eine distale pulmonale Barriere eingesetzt, die Ausbildung einer funktionellen Barriere aber wenig untersucht. Eine neuere Doktorarbeit beschäftigte sich mit einer Ko-Kultur von A549 mit der Endothelzell-Linie ECV304 zur Untersuchung der Wirkung von Ultrafeinen Partikeln auf die Zellen der alveolo-kapillären Barriere (Wottrich, 2004). Hier wurden ein maximaler elektrischer Widerstand von 180 Ω x cm² für die Ko-Kultur von A549 mit ECV304 ermittelt (Wottrich, 2004).

Nach den Ergebnissen meiner Arbeit lassen sich Ko-Kulturen von A549 mit der mikrovaskulären Endothelzell-Linie ISO-HAS-1 oder primär isolierten HPMEC für Experimente, die die Ausbildung einer dichten epithelialen Barriere voraussetzen, nicht einsetzen. Außerdem scheinen die Freisetzung von RANTES und die Expression von VCAM-1 bei A549 eher einen bronchialen Phänotyp dieser Zell-Linien zu zeigen. Der Einsatz von Ko-Kulturen mit A549 für toxikologische sowie mikrobiologische Studien, die eher die metabolischen Eigenschaften dieser Zell-Linie berücksichtigen, bleibt jedoch weiterhin interessant, da die Zell-Linie A549 am besten charakterisiert ist. Dabei sollten Studien ohne Dexamethason am Tag 7 der Ko-Kultivierung und mit Dexamethason von Tag 10-12 der Ko-Kultivierung durchgeführt werden, da sich nach diesen Zeiten Monolayer von A549 und den jeweiligen Endothelzellen am stabilsten etablieren. Eine kürzlich erschienene Studie beschreibt die Ausbildung von *Tight Junctions* bei Zellaggregaten von A549 in dreidimensionaler Kultur (Carterson et al., 2005). Diese Zellaggregate von A549 Zellen wurden als ein gegenüber Monolayer-Kulturen physiologisch relevanteres Modell zur Untersuchung eines mikrobiellen Infektionswegs eingesetzt. Für die Zell-Linie A549 ist demnach eine Monolayer-Kultur auf mikroporösen Filtermembranen nicht die optimale Kultivierungsform.

Für NCI H441 konnte die Ausbildung eines kontaktinhibierten Monolayers bei Zugabe von Dexamethason am Tag 3 der Ko-Kultivierung induziert werden. Die Endothelzellen in Bilayer-Ko-Kultur bildeten unter diesen Bedingungen ebenfalls einen konfluenten zellulären Monolayer mit gut ausgeprägten Zell-Zell-Kontakten aus. Im Hinblick auf die Ausbildung einer funktionellen Barriere zeigten Bilayer-Ko-Kulturen von NCI H441 mit ISO-HAS-1 oder HPMEC bei Zugabe von Dexamethason alle gewünschten Kriterien, wie die Ausbildung von TER-Werten um 500 Ω x cm²,

eine regelmäßige Expression von ZO-1 und E-Cadherin bei NCI H441 an den Zell-Zell-Grenzen benachbarter Zellen und einen pflastersteinartigen zellulären Layer der Endothelzellen mit verstärkter Expression von VE-Cadherin an den an den Zell-Zell-Kontaktstellen. Während HPMEC einen streng kontaktinhibierten Monolayer ausbildeten, wurde für die Angiosarkomzell-Linie ISO-HAS-1 partiell ein Multilayer beobachtet. ISO-HAS-1 ließen sich demnach unter den gewählten Kulturbedingungen nicht streng als Monolayer kultivieren. Durch den Einsatz von Dexamethason wurde jedoch, trotz starker angiogener Tendenz der Zell-Linie, ein differenzierter Layer von ISO-HAS-1 mit pflastersteinartiger Morphologie ausgebildet. Reproduzierbar stabile TER-Werte mit differenzierten kuboidalen Epithelzellen und einem konfluenten endothelialen Monolayer ließen sich für beide Ko-Kulturen (NCI H441/ISO-HAS-1 und NCI H441/HPMEC) mit Dexamethason von Tag 10 bis 12 der Bilayer-Ko-Kultur in RP/MC Medium etablieren.

Für Mono-Kulturen von NCI H441 wurden TER-Werte von $241 \pm 2 \Omega \times \text{cm}^2$ in RP/MC Medium mit $1 \mu\text{M}$ Dexamethason ermittelt. Durch Ersatz des Anteils von 10% FKS in RPMI durch 8,5% FKS, das hormon- und wachstumsfaktorfrei war, konnten von einer anderen Arbeitsgruppe für die Mono-Kultur von NCI H441 TER-Werte von $344 \pm 86 \Omega \times \text{cm}^2$ ohne Dexamethason und $568 \pm 47 \Omega \times \text{cm}^2$ mit Dexamethason gemessen werden (Ramminger et al., 2004). Demnach scheinen nicht nur Dexamethason und die Ko-Kultur mit Endothelzellen, sondern auch Hormone und Wachstumsfaktoren im Serum die TER-Werte der NCI H441 Zellen zu beeinflussen. Für Mono-Kulturen von NCI H441 wurden aber auch erheblich höhere TER-Werte von $1900 \pm 360 \Omega \times \text{cm}^2$ in RPMI mit 10% FKS beschrieben (Lazrak und Matalon, 2003). TER-Werte in dieser Höhe konnten in eigenen Experimenten für NCI H441 nicht bestätigt werden. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass von den Arbeitsgruppen verschiedene Klone von NCI H441 verwendet wurden.

Die im Vergleich zu Mono-Kulturen humaner primär isolierter Alveolarepithelzellen (TER-Werte $>1000 \Omega \times \text{cm}^2$) wesentlich geringeren maximalen TER-Werte der NCI H441 Zellen könnten über die Ausbildung von weniger *Tight Junction* Strängen und/oder die unterschiedliche Aktivität transzellulärer Iontentransporter der NCI H441 Zellen im Vergleich zu primären Alveolarepithelzellen erklärt werden. Dabei sollte beachtet werden, dass die hohen TER-Werte humaner Alveolarepithelzellen keinen reinen hATII Zell-Layer darstellen, da sie in serumhaltigem Medium bei Zellen mit hATII und hATI-ähnlichem morphologischen Phänotyp ermittelt wurden. Die niedrigeren TER-Werte könnten aber auch auf den bronchiolären Charakter der Clarazell-ähnlichen NCI H441 hinweisen. TER-Werte bronchialer Epithelzellen wurden im Bereich von $500\text{-}1000 \Omega \times \text{cm}^2$ für humane Primärzellen (Coyne et al., 2002; Yoo et al., 2003) und $500\text{-}800 \Omega \times \text{cm}^2$ für die immortalisierte Zell-Linie 16HBE14o- ermittelt (Ehrhardt et al., 2002).

Je nach Wahl des Kulturmediums und auch der Messmethode wurden auch bei anderen Zellkulturmodellen unterschiedliche TER-Werte beschrieben. So zeigten verschiedene Arbeitsgruppen für Mono-Kulturen der intestinalen Zell-Linie Caco-2 TER-Werte von $150 \Omega \times \text{cm}^2$ bis zu Werten von $600 \Omega \times \text{cm}^2$ (Lindmark et al., 1998; Tavelin et al., 1999; Masungi et al., 2004). Nierenzellen des

Hundes (MDCK) bildeten je nach Klon TER-Werte von 150-350 $\Omega \times \text{cm}^2$ (MDCK I) bzw. 2000-10000 $\Omega \times \text{cm}^2$ (MDCK II) (Ward et al., 2000). Ward und Mitarbeiter (Ward et al., 2000) klassifizierten die Dichte von epithelialen Zell-Layern anhand der maximal ausgebildeten TER-Werte und definierten TER-Werte von 10-50 $\Omega \times \text{cm}^2$ (hoch permeabel) als durchlässiges Epithel, von 300-1000 $\Omega \times \text{cm}^2$ als intermediär bis dicht und $>1000 \Omega \times \text{cm}^2$ (wenig permeabel) als dichtes Epithel.

Die Messung des TER-Wertes hängt vom Netto-Ionentransport über den zellulären Layer und dabei größtenteils vom parazellulären Ionentransport ab. Der TER-Wert kann aber auch durch einen gestörten transzellulären Ionentransport beeinflusst werden (Tang und Goodenough, 2003). Daher wurde zusätzlich zur Messung des TER-Wertes die Integrität einer Bilayer-Ko-Kultur beurteilt, indem der Transport eines hydrophilen Markermoleküls, wie z.B. Natrium-Fluoreszein, das passiv entlang der parazelluläre Route über beide Monolayer transportiert wird, ermittelt wurde. Anhand von Studien an Caco-2 Monolayern wurden Substanzen mit einem apparenten Permeabilitätskoeffizienten (P_{app}) von weniger als 1×10^{-6} cm/sec als niedrig permeabel klassifiziert, mittel permeable Substanzen zeigen P_{app} -Werte unter 1×10^{-5} cm/sec und hoch permeable Substanzen besitzen Permeabilitätskoeffizienten über 1×10^{-5} cm/sec (Yee, 1997). Der hydrophile Marker Natrium-Fluoreszein ist als niedrig permeabel eingestuft. Wird eine dichte epitheliale Barriere aufgebaut, sollte der P_{app} -Werte von Natrium-Fluoreszein $< 1 \times 10^{-6}$ cm/sec sein.

NCI H441 in Mono-Kultur mit $1 \mu\text{M}$ Dexamethason zeigten einen P_{app} -Wert von $1,11 \times 10^{-6}$ cm/sec für Natrium-Fluoreszein, während sie ohne Dexamethason-Zugabe mit $P_{\text{app}} = 3,65 \times 10^{-6}$ cm/sec für Natrium-Fluoreszein hoch permeabel waren. Im Vergleich dazu ist für die bronchiale Zell-Linie 16HBE1o- ein P_{app} -Wert von $0,85 \times 10^{-6}$ cm/sec für Natrium-Fluoreszein in Mono-Kultur beschrieben (Ehrhardt et al., 2002). Da mikrovaskuläre Endothelzellen keinen den Epithelzellen vergleichbar dichten Layer ausbilden, sind sie für den hydrophilen Marker Natrium-Fluoreszein hoch permeabel und zeigen Permeabilitätskoeffizienten von $11,8 \times 10^{-5}$ cm/sec (Waters et al., 1996). Um die Integrität eines endothelialen Layer zu beurteilen wird der parazelluläre Transport größerer Moleküle, wie von Dextranen verschiedener Molekulargewichte ermittelt (Hashida et al., 1986) oder die Permeabilität von Albumin (Chang et al., 2000), das sowohl parazellulär als auch transzellulär transportiert wird, bestimmt. Aus diesem Grund wurde der Permeabilitätskoeffizient für Natrium-Fluoreszein bei den Bilayer-Ko-Kulturen von Epithel- und Endothelzellen im Wesentlichen von der Dichte des epithelialen Layers beeinflusst.

Der Aufbau eines dichten Bilayers nach Zugabe von $1 \mu\text{M}$ Dexamethason wurde über den Nachweis eines niedrigen Permeabilitätskoeffizienten von Natrium-Fluoreszein in Krebs-Ringer Puffer mit $P_{\text{app}} = 0,51$ bzw. $0,81 \times 10^{-6}$ cm/sec bei NCI H441/ISO-HAS-1 bzw. NCI H441/HPMEC am Tag 11 der Ko-Kultur bestätigt. An den bereits beschriebenen Bilayer-Modellen von A549 mit diversen Endothelzellen wurde der parazelluläre Transport des kleinen, hydrophilen Markers Natrium-Fluoreszein nicht ermittelt, hier liegen nur Daten zum Transport größerer Moleküle vor, wie Dextranen und Albumin (Birkness et al., 1999; Casale und Carolan, 1999; Hu et al., 2005).

4.8 Primärzellen in Ko-Kultur

Die Ko-Kultur der primären Alveolarepithelzellen mit humanen pulmonalen mikrovaskulären Endothelzellen (HPMEC) diente als Referenz für ein *in vivo nahe*s Ko-Kulturmodell der Zell-Linien. Anhand der Eigenschaften der Primärzellen in Ko-Kultur war die Eignung der Zell-Linien in Ko-Kultur als Modell einer alveolo-kapillären Einheit zu beurteilen. Daher sollten die isolierten Primärzellen in Bilayer-Ko-Kultur ebenfalls zu kontaktinhibierten Monolayern mit dichten Zell-Zell-Kontakten differenzieren. Dabei stellte die rasche Trans- bzw. Dedifferenzierung der hATII Zellen innerhalb weniger Tage in Primärkultur hohe Anforderungen an das primäre Ko-Kulturmodell. Da die HPMEC in serumfreiem Epithelzellmedium nicht überlebten, konnte für die primären Ko-Kulturen ein serumfreies Milieu, das den hATII-Phänotyp begünstigte, nicht aufrechterhalten werden. Im unteren Well der Bilayer-Ko-Kultur musste ein serumhaltiges Endothelzellmedium (PC mit 15% FKS, bFGF/Heparin) verwendet werden.

Wurden subkultivierte, ungetrennte hATII* Zellen mit HPMEC ko-kultiviert, wuchsen häufig kontaminierende Fibroblasten auf den Filtermembranen und störten die Ausbildung einer dichten epithelialen Zellschicht. Durch positive Selektion mit CD44v6-Beads konnte eine fibroblastenfreie Reinkultur von hATII* Zellen isoliert werden. Diese CD44v6 positiven hATII* Zellen (CD44v6⁺ ATII*) zeigten im Vergleich zu ungetrennten hATII* höhere und gleichmäßigere TER-Werte in Ko-Kultur mit HPMEC. In Mono-Kultur konnte durch die Zugabe von Dexamethason ein kontaktinhibierter Monolayer der CD44v6⁺ ATII* in zweiter Passage etabliert werden. Trotz Zugabe von Dexamethason waren CD44v6⁺ hATII* Zellen in zweiter Passage in Bilayer-Ko-Kultur mit HPMEC nicht mehr in der Lage einen kontaktinhibierten Monolayer auszubilden. Für das mehrschichtige Wachstum der CD44v6⁺ ATII* in Bilayer-Ko-Kultur sind wahrscheinlich parakrine Faktoren der HPMEC verantwortlich. Dass HPMEC einen parakrinen Einfluss auf die Differenzierung der CD44v6⁺ ATII* haben, zeigte sich in der Ausbildung einer dichten Barriere mit TER-Werten von $>800 \Omega \times \text{cm}^2$ und einer regelmäßigen Lokalisation von ZO-1 und E-Cadherin an den Zell-Zell-Grenzen nach 14 Tagen in Bilayer-Ko-Kultur. Bei subkultivierten hATII* Zellen war die Ko-Kultur mit HPMEC und serumhaltiges Kulturmedium im unteren Well für die Ausbildung von *Tight Junctions* notwendig, während der basolaterale Kontakt mit serumhaltigem Medium alleine nicht ausreichte, um einen dichten Layer von hATII* Zellen zu induzieren (siehe Abb. 70, S. 135).

Die Ausbildung eines differenzierten, kontaktinhibierten Monolayers von Alveolarepithelzellen mit einer dichten epithelialen Barriere ist bisher für die Primärkultur nur gelungen, wenn die hATII Zellen direkt nach der Isolation (in P0) auf Filtermembranen kultiviert wurden. Dabei waren die TER-Werte der Mono-Kulturen mit maximal $1300\text{-}1500 \Omega \times \text{cm}^2$ in SAGM mit 1% FKS vergleichbar mit den für primär isolierte humane Alveolarepithelzellen vom Typ II bereits beschriebenen TER-Werten. Hier wurden nach ca. 8 Tagen in Kultur TER-Werte $>1000 \Omega \times \text{cm}^2$ bzw. maximale TER-Werte von $2100 \Omega \times \text{cm}^2$ erreicht und korrelierten mit dem Vorkommen einer Mischkultur von ATII Zellen und ATI-ähnlichen Zellen (Elbert et al., 1999; Fuchs et al., 2003).

Zur Aufrechterhaltung eines strikten Monolayers war die Kultivierung der primären hATII Zellen in serumhaltigem SAGM mit 1% FKS notwendig, in serumfreiem AEGM traten nach ca. 7 Tagen in Ko-Kultur vereinzelt Areale mehrschichtig wachsender Epithelzellen auf. In SAGM mit 1% FKS zeigten die Zellen nach 10-13 Tagen in Ko-Kultur morphologische Phänotypen von hATII und abgeflachten hATI-ähnlichen Zellen. Die Ausbildung eines epithelialen Monolayers war eine wichtige Voraussetzung für die Ausbildung einer funktionellen epithelialen Barriere, daher stellte SAGM mit 1% FKS das geeignetere Medium für eine *in vivo* nahe Ko-Kultur dar. Das SAGM Medium mit 1% FKS begünstigte zwar die Transdifferenzierung der hATII Zellen in P0, doch konnten hATII Zellen wegen des Serumbedarfs der HPMEC in Ko-Kultur ohnehin nicht komplett serumfrei kultiviert werden. Unter den gewählten Bedingungen war eine Ko-Kultur von Zellen mit reinem hATII-Phänotyp mit HPMEC nicht etablierbar.

Die Ko-Kulturen der hATII/hATI-ähnlichen Zellen in P0 mit HPMEC erreichten im Hinblick auf die Ausbildung einer dichten Barriere hohe TER-Werte um $1800 \Omega \times \text{cm}^2$ bis maximal $2600 \Omega \times \text{cm}^2$ von Tag 5 bis Tag 9. Dabei lagen die TER-Werte der Bilayer-Ko-Kultur um im Mittel $300\text{-}500 \Omega \times \text{cm}^2$ höher als die der Mono-Kultur von hATII/ATI-ähnlichen Zellen. Wurden beide Zelltypen nicht als Bilayer sondern mit hATII/hATI-ähnlichen Zellen auf der Filtermembran und HPMEC auf dem Boden der Cluster-Platte ko-kultiviert, so waren die TER-Werte im Vergleich zur Mono-Kultur der hATII/hATI-ähnlichen Zellen nicht erhöht. Über die Interaktion von Alveolarepithelzellen mit mikrovaskulären Endothelzellen ist wenig bekannt. Konditioniertes Medium pulmonaler Endothelzellen stimuliert das Wachstum fötaler Lungenepithelzellen (Smith und Giannopoulos, 1985). Auf endothelialer extrazellulärer Matrix gezüchtete primär isolierte ATII Zellen der Ratte zeigten eine erhöhte Proliferationsrate und eine schnellere Transdifferenzierung zu ATI-ähnlichen Zellen als Zellen, die auf Gewebekulturplastik oder Matrigel kultiviert wurden (Adamson und Young, 1996). Parakrine Faktoren scheinen die Erhöhung des TER-Wertes der Bilayer-Ko-Kulturen gegenüber der Ko-Kultur mit HPMEC auf dem Boden der Cluster-Platte nicht auszulösen. Wahrscheinlich ist die Ausbildung einer zweiten Barriere, der endothelialen Barriere für die Erhöhung des TER-Wertes der Bilayer-Ko-Kultur verantwortlich. Ferner könnten verschiedene Zell-Zell-Kontakte, die zwischen beiden Typen von Alveolarepithelzellen den ATII Zellen und ATI-ähnlichen Zellen und innerhalb der ATII Zellen bzw. der ATI-ähnlichen Zellen ausgebildet werden (Isakson et al., 2002; Isakson et al., 2003), für die erhöhten TER-Werte verantwortlich sein.

4.9 Funktionelle Untersuchung der etablierten Ko-Kulturen

4.9.1 Faktoren, die die TJ Barriere beeinflussen

Die Alveolarschranke der Lunge besteht aus der epithelialen Deckschicht der Alveolen, einer Bindegewebsschicht sowie mikrovaskulärem Endothel. Diese bilden wiederum drei separate Kompartimente: das alveoläre Lumen, das interstitielle Gewebe und das vaskuläre Lumen. Beide barrierebildende Zelltypen, das Alveolarepithel und das mikrovaskuläre Endothel, sind häufig Orte akuter Lungenschäden (Travis et al., 1977; McCullough et al., 1978). Lungenschäden können durch

verschiedene Insulte herbeigeführt werden, zu denen neben Infektionen, organischen Stäuben, Toxinen und allergenen Substanzen auch Schock und Sepsis gehören (Blennerhassett, 1985; Buergelt, 1995; Perry et al., 1998; Perron Lepage et al., 1999; Chung et al., 2002; Erasmus et al., 2002; Tateda et al., 2003). Als Antwort auf inhalative Noxen wird unter Anderem die Ionen-transport- bzw. Barrierefunktion des Alveolarepithels verändert. Bei akuten und chronischen entzündlichen Prozessen der Lunge kommt es häufig zum kompletten Zusammenbruch der Barriere des Alveolarepithels. Komplikationen bei schwerverletzten Patienten sind neben der akuten Lungenschädigung (Acute Lung Injury) das Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS). Insbesondere beim ARDS ist die Zerstörung der alveolo-kapillären Barriere zu beobachten, dabei werden bevorzugt die kapillären Endothelzellen und die Typ I Alveolarepithelzellen geschädigt (Dreyfuss et al., 1985; Dreyfuss et al., 1988). Die Schäden stellen sich elektronenmikroskopisch in Form von Nekrosen und der Ablösung der Basalmembran dar. Alveolarepithelzellen vom Typ II ersetzen dabei geschädigt Typ I Alveolarepithelzellen (Fehrenbach et al., 1999). Beim Verlust der endothelialen Barriere diffundieren Proteine, wie z.B. Albumin, ins interstitielle Gewebe und beeinflussen durch den erzeugten osmotischen Druck die Flüssigkeitshomöostase im Alveolarraum (Matthay, 2002; Matthay et al., 2002b; Sartori und Matthay, 2002). Bisher wurden bei der Untersuchung der Pathogenese von Lungenfunktionsstörungen hauptsächlich die Veränderungen der Endothelzellen untersucht. Das Alveolarepithel der alveolo-kapillären Barriere wurde wenig beachtet, obwohl es eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Flüssigkeitshomöostase im Alveolarraum spielt (Borok et al., 1996). Beim differenzierten Alveolarepithel wird mit Hilfe von Ionenpumpen aktiv ein Ionengradient aufgebaut, damit Wasser über Wasserkanäle, sogenannte Aquaporine, passiv transportiert werden kann (Folkesson et al., 1994). Dabei kommt dem polarisierten Aufbau der Alveolarepithelzelle in eine apikalen und eine basolaterale Domäne große Bedeutung zu. Die Schädigung des Alveolarepithels spielt wahrscheinlich eine ebenso wichtige Rolle bei der Pathophysiologie einer Lungenfehlfunktion von Schwerverletzten wie die des Kapillarendothels.

Akute Lungenschäden werden, unabhängig von der Art des Auslösers, häufig von einer Entzündungsreaktion begleitet. Die Entzündungsreaktion kann ursächlich zum Verlust der Barrierefunktion beitragen. Zum einen können bei einer Entzündungsreaktion Immunzellen, wie zum Beispiel Granulozyten und Monozyten, durch *early response* Zytokine rekrutiert werden. Die Aktivierung dieser eingewanderten Immunzellen löst wiederum eine Sekretion von Proteasen und Sauerstoffmetaboliten und dadurch die Schädigung des Kapillarendothels und des Alveolarepithels aus (Bachofen und Weibel, 1977; Matthay, 1994). Zum anderen zeigen *early response* Zytokine aber auch eine direkte Wirkung auf die Strukturzellen der alveolo-kapillären Einheit, indem sie die Freisetzung sekundärer inflammatorischer Mediatoren auslösen und/oder über Veränderungen der Barrierefunktion direkt zum Funktionsausfall der Alveolarschranke beitragen (Bachofen und Weibel, 1977; Matthay, 1994). Die *Tight Junctions* sind dynamisch regulierte Diffusionsbarrieren, die auf verschiedene physiologische, pharmakologische und pathologische Bedingungen reagieren können (Anderson und

Van Itallie, 1995). Eine veränderte Expression bzw. Funktion von *Tight Junction* Proteinen bei den Alveolarepithelzellen würde den Zusammenbruch von Ionengradienten und den Verlust der treibenden Kraft für einen Wassertransport aus dem Alveolarlumen bedeuten. Desweiteren bedeutet der Verlust der „fence function“ der *Tight Junctions* einen Verlust der Polarisierung der Alveolarepithelzellen und beeinflusst daher weitere Transportfunktionen dieser Zellen (Schneeberger und Lynch, 1992).

Durch physiologische Stimuli der inflammatorischen Kaskade wie TNF- α und IFN- γ konnte *in vitro* sowohl die funktionelle Barriere der Bilayer-Ko-Kultur der Zell-Linie NCI H441 mit HPMEC oder ISO-HAS-1 als auch die funktionelle Barriere der Primärzellen beeinflusst werden. Dabei reagierten die beiden Ko-Kulturen der epithelialen Zell-Linie bereits nach 24-stündiger basolateraler Stimulation mit einer Reduktion der TER-Werte, während die Ko-Kulturen der Primärzellen erst nach 48 h Veränderungen zeigten. Für *early response* Zytokine und IFN- γ ist bei verschiedenen Epithelzellen eine Wirkung auf die Barrierefunktion und eine Veränderung der parazellulären Permeabilität beschrieben. Verschiedene Effekte dieser Zytokine, wie z.B. auf das zytoplasmatische Plaqueprotein der *Tight Junctions*, ZO-1, und die Struktur der *Tight Junctions*, wurden bei intestinalen Zellen gezeigt (Adams et al., 1993; Fish et al., 1999; Schmitz et al., 1999). So führte eine Inkubation von intestinalen Epithelzellen mit TNF- α und IFN- γ zu einer erhöhten parazellulären Permeabilität und einer Reorganisation der *Tight Junction* Proteine ZO-1, JAM-1, Occludin, Claudin-1 und Claudin-4 (Bruewer et al., 2003). Diese Veränderungen der parazellulären Permeabilität durch TNF- α waren mit einer Steigerung der Phosphorylierung der Myosin-Leichtketten-Kinase (Myosin Light Chain Kinase, MLCK) verbunden und konnten durch einen Inhibitor der MLCK umgekehrt werden (Bruewer et al., 2003). In eigenen Experimenten war die Lokalisation des zytoplasmatische Plaqueproteins der *Tight Junctions*, ZO-1, durch eine 48-stündige basolaterale Stimulation der Bilayer-Ko-Kultur mit TNF- α nicht beeinflusst. Die reduzierte Markierung von E-Cadherin an den Zell-Zell-Grenzen basolateral mit TNF- α stimulierter NCI H441 in Bilayer-Ko-Kultur, die nach Wegnahme der Stimulanzien wieder hergestellt werden konnte, gibt erste Hinweise auf die Wirkung von TNF- α auf Zell-Zell-Kontaktmoleküle von distalen pulmonalen Epithelzellen. Eine genauere Aufklärung dieser Effekte erfordert weitere Studien, z.B. zur Rolle der Myosin-Leichtketten-Kinase bei der Organisation des Aktinzytoskeletts und der Reorganisation anderer *Adherens* und *Tight Junction* Proteine bei NCI H441 in Bilayer-Ko-Kultur.

Wie bei anderen Epithelzellen beschrieben, hatte eine basolaterale Gabe von TNF- α einen signifikanten Einfluss auf die Erniedrigung des TER-Werts der etablierten Ko-Kulturmodelle, sowohl bei den Zell-Linien als auch bei den Primärzellen. Trotz deutlicher Erniedrigung des TER-Wertes um ca. 30 \pm 5% wurde nach basolateraler Gabe von TNF- α nur eine leichte Erhöhung des Permeabilitätskoeffizienten von Natrium-Fluoreszein bei der Bilayer-Ko-Kultur gemessen. Dieser wurde erst nach ko-stimulatorischer basolateraler Gabe von IFN- γ und TNF- α signifikant erhöht. Auch bei bronchialen Epithelzellen wurde *in vitro* eine Veränderung der parazellulären Permeabilität durch einen ko-stimulatorischen Effekt von IFN- γ und TNF- α beschrieben, während die alleinige Gabe von TNF- α

keinen Effekt zeigte (Coyne et al., 2002). Da die parazelluläre Permeabilität von Natrium-Fluoreszein (MG 376.3 Da) bei der Bilayer-Ko-Kultur im Wesentlichen von der Dichte des epithelialen Layers abhing, kann vermutet werden, dass die Erniedrigung des TER-Wertes nach basolateraler Gabe von TNF- α die Folge einer veränderten endothelialen Barriere war. Eine solche Veränderung der endothelialen Barrierefunktion durch TNF- α wurde bei HUVEC durch die Ausbildung interzellulärer Lücken gezeigt, die mit einer reduzierten Lokalisation von VE-Cadherin an den *Adherens Junctions* einherging (Wojciak-Stothard et al., 1998). Außerdem erhöht TNF- α die endothelialen Permeabilität für größere Moleküle, wie Albumin und Dextrane, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (Johnson et al., 1989; Goldblum et al., 1993; Ferro et al., 1997; Ferro et al., 2000). Für Lungenendothelzellen ist eine signifikante Erhöhung der Permeabilität durch IFN- γ und IL-1 β beschrieben, während sekundäre inflammatorische Mediatoren, wie GM-CSF, G-CSF, IL-8, IL-6, und RANTES keine Wirkung zeigten (Sedgwick et al., 2002). Der nach basolateraler Gabe von TNF- α veränderte TER-Wert der Bilayer-Ko-Kultur konnte durch Wegnahme von TNF- α reversibel wieder auf Kontrollniveau eingestellt werden. Im Gegensatz dazu war die durch Zugabe von TNF- α +IFN- γ erzielte Reduktion des TER-Werts durch Wegnahme der Zytokine innerhalb von 24 h nicht wieder auf das Niveau der unbehandelten Kontrolle herstellbar. Wie bei der Bilayer-Ko-Kultur der Linien konnte eine apikale Gabe von TNF- α sowie TNF- α +IFN- γ den TER-Wert und den Permeabilitätskoeffizienten der Primärkulturen nur unwesentlich beeinflussen. Weiter wirkte sich die Zytokinbehandlung deutlicher auf den Permeabilitätskoeffizienten als auf den TER-Wert aus. Diese Beobachtungen sprechen für eine durch die Zytokine ausgelöste, lokale Veränderung der Zell-Zell-Kontaktmoleküle, die einen lokal verstärkten parazellulären Transport von Natrium-Fluoreszein erlaubten, während der TER-Wert, der den Netto-Ionentransport über den gesamten zellulären Bilayer erfasst, weniger deutlich beeinflusst wurde.

Obwohl die Bilayer-Ko-Kulturen der Primärzellen ($1800\text{-}2600 \Omega \times \text{cm}^2$) wesentlich höhere TER-Werte als die Bilayer-Ko-Kulturen von NCI H441 mit HPMEC ($500 \Omega \times \text{cm}^2$) zeigten, lagen die Permeabilitätskoeffizienten für Natrium-Fluoreszein ohne Stimulation und nach Stimulation mit Zytokinen in vergleichbar Höhe. Auch für andere Zell-Linien konnte gezeigt werden, dass sich oberhalb eines Schwellenwertes von $300\text{-}400 \Omega \times \text{cm}^2$ der Permeabilitätskoeffizient für Natrium-Fluoreszein nur unwesentlich verringerte (Gindorf et al., 2001). Für den parazellulären Transport eines weiteren kleinen Fluorochroms, Lucifer yellow (MG 457 Da), wurde ebenfalls bei TER-Werten über $300 \Omega \times \text{cm}^2$ keine wesentliche Veränderung des Permeabilitätskoeffizienten bei der bronchialen Zell-Linie Calu-3 festgestellt (Foster et al., 2000). Dieser Trend zeigte sich auch bei Untersuchungen primär isolierter Alveolarepithelzellen vom Type II der Ratte (Adson et al., 1994). Mögliche Unterschiede der zellulären Barrieren zwischen Zell-Linien bzw. Primärzellen, die sich durch die unterschiedlich hohen TER-Werte andeuten, könnten mit Hilfe parazellulär transportierter Molekülen definierter Größe, wie Dextranen verschiedener Molekulargewichte, in weiterführenden Studien detaillierter untersucht werden.

4.9.2 Vergleichende Untersuchung der Epithel- und Endothelzellen in Ko-Kultur: CAM-Expression und Freisetzung sekundärer inflammatorischer Mediatoren

Zusätzlich zur direkten Schädigung der Zellen durch äußere Reize können Epithel- und Endothelzellen als Effektoren fungieren, die als Antwort auf primäre inflammatorische Mediatoren wie TNF- α und IL-1 β sekundäre inflammatorische Mediatoren sezernieren, die ihrerseits wiederum (parakrin oder autokrin) pathophysiologische Veränderungen hervorrufen. IL-6, IL-8, MCP-1 und RANTES wurden repräsentativ aus den vielen sekundären Mediatoren, deren Sekretion für Endothelzellen bzw. respiratorische Epithelzellen beschrieben wird, ausgewählt und deren stimulationsinduzierte Freisetzung an Bilayer-Ko-Kulturen untersucht. Die Freisetzung der löslichen Adhäsionsmoleküle sICAM-1 und sVCAM-1 und von sekundären Zytokinen wurde an Bilayer-Ko-Kulturen von NCI H441 mit HPMEC und Bilayer-Ko-Kulturen von hATII Zellen in P0 mit HPMEC (Primärzell-Ko-Kulturen) mit und ohne Stimulation untersucht. Der ko-stimulatorische Effekt von IFN- γ + TNF- α wurde mit dem von IFN- γ und TNF- α alleine auf die Freisetzung sekundärer inflammatorischer Mediatoren bei beiden Bilayer-Ko-Kulturen untersucht. Da die Kulturmedien der Ko-Kultur von NCI H441/HPMEC und die der Ko-Kultur der Primärzellen unterschiedlich waren, war ein direkter Vergleich der absolut freigesetzten Zytokinmenge nicht möglich. Daher wurde nur das Muster der Zytokinfreisetzung nach Stimulation für beide Ko-Kulturen verglichen und ein eventueller ko-stimulatorischer Effekt der einzelnen Zelltypen in Bilayer-Ko-Kultur untersucht.

Da in Bilayer-Ko-Kultur von beiden Zelltypen inflammatorische Mediatoren abgegeben werden können, werden die Ergebnisse der Stimulation mit TNF- α für NCI H441, HPMEC und hATII Zellen in Mono-Kultur im Folgenden zur Erinnerung kurz zusammengefasst. Unter vergleichbaren Kulturbedingungen wie in Bilayer-Ko-Kultur (10-tägige Kultur) zeigten NCI H441 in Mono-Kultur sowohl mit als auch ohne Dexamethason eine stimulationsinduzierte Expression von ICAM-1, IL-8 und MCP-1 nach Stimulation mit TNF- α , während die Basisexpression von IL-6 nicht beeinflusst wurde. NCI H441 produzierten weder sVCAM-1 noch RANTES nach Stimulation. HPMEC dagegen sezernierten nach Stimulation mit TNF- α sVCAM-1, RANTES und MCP-1 sowie erhöhte Mengen von ICAM-1, sICAM-1, IL-6 und IL-8 in Mono-Kultur. Da für hATII Zellen direkt nach Aussaat (in P0) in Mono-Kultur keine sekundären inflammatorischen Mediatoren nach Stimulation bestimmt wurden, können für die Mono-Kultur nur Daten von CD44v6⁺ hATII* in zweiter Passage (P2) angegeben werden. Hier wurden nach Stimulation mit TNF- α geringe Mengen von MCP-1 ins Medium sezerniert und die basale Sekretion von IL-8 und IL-6 erhöht. Wie NCI H441 produzierten CD44v6⁺ hATII* (P2) weder sVCAM-1 noch RANTES nach Stimulation.

Die Synthese des Zelladhäsionsmoleküls ICAM-1 war bei den CD44v6⁺ hATII* (P2) in Mono-Kultur nicht nur von deren Stimulation sondern auch von einer Zugabe von fötalem Kälberserum (FKS) zum Kulturmedium abhängig. Die Erhöhung von ICAM-1 wird mit der Transdifferenzierung der hATII Zellen zu hATI-ähnlichen Zellen assoziiert (siehe Kap.4.5) (Christensen et al., 1993; Paine et al., 1994). Im Gegensatz zu CD44v6⁺ hATII* Zellen (P2) in serumfreiem Medium und hATII

Zellen *in situ*, die kein ICAM-1 exprimieren, zeigte die Zell-Linie NCI H441 eine hohe basale Expression von ICAM-1.

Da bisher beschriebene Bilayer-Ko-Kulturmodelle der alveolo-kapillären Barriere keine dichte epitheliale Barriere ausbilden, ist dies die erste Studie, die eine Freisetzung sekundärer Immunmediatoren nach apikaler und basolateraler Stimulation an einem intakten epithelialen-endothelialen Bilayer beschreibt. Wurden die Zellen in Bilayer-Ko-Kultur nach der Etablierung einer funktionellen Barriere (10-tägige Kultur) stimuliert, konnte zwischen einer apikalen (auf epithelialer Seite) und basolateralen Stimulation (auf endothelialer Seite) klar unterschieden werden. IFN- γ (2000 U/ml) alleine löste bei NCI H441/HPMEC und hATII/HPMEC weder apikal noch basolateral eine gegenüber der Kontrolle erhöhte Zytokinfreisetzung aus. Wurden TNF- α oder IFN- γ + TNF- α apikal zugegeben, so wurde auch nur *ipsilateral* eine Veränderung der Zytokinfreisetzung gemessen. Eine Ausnahme bildete die Sekretion von IL-8, die nach apikaler Stimulation nicht nur *ipsilateral* sondern auch *contralateral* leicht zunahm. Bei beiden Ko-Kulturen reduzierte IFN- γ + TNF- α deutlich den TER-Wert und könnte damit die Barrierefunktion der Epithelzellen negativ beeinflusst haben. Vielleicht fand aufgrund der Erhöhung der parazellulären Permeabilität eine Diffusion von IL-8 ins untere Well statt oder die Stimulanzien konnten die gestörte epitheliale Barriere passieren und die HPMEC zur *contralateralen* Sekretion von IL-8 (ins obere Well) anregen. Diese Hypothesen könnten durch Stimulation von Mono-Kulturen der epithelialen Zellen, NCI H441 und hATII Zellen in P0, auf Filtermembranen im Vergleich zu den Bilayer-Ko-Kulturen überprüft werden.

Wurden TNF- α oder IFN- γ + TNF- α basolateral zugegeben, war außer einer leichten Erhöhung der Freisetzung von IL-8 bei beiden Bilayer-Ko-Kulturen und IL-6 bei den Primär-Ko-Kulturen keine Veränderung der *contralateralen* Zytokinfreisetzung nachweisbar. Nach basolateraler Zugabe der Stimulanzien (d.h. apikaler Stimulation der HPMEC auf der Unterseite des Filters) wurde durch TNF- α und meist ko-stimulatorisch durch IFN- γ + TNF- α eine *ipsilaterale* Freisetzung von sICAM-1, sVCAM-1, IL-6, IL-8, MCP-1 und RANTES gemessen. Besonders deutlich wurde die ko-stimulatorische Wirkung von IFN- γ + TNF- α durch die erhöhte Freisetzung von RANTES, dessen Freisetzung durch TNF- α alleine kaum induziert wurde. Die HPMEC in Bilayer-Ko-Kultur mit Dexamethason-behandelten NCI H441 waren ähnlich reaktiv wie die HPMEC in Mono-Kultur.

Die Freisetzung der untersuchten inflammatorischen Mediatoren war bei HPMEC um 5-10fach höher als die der Epithelzellen, sowohl in Ko-Kultur mit NCI H441 als auch mit hATII Zellen in P0. Die HPMEC scheinen empfindlicher auf eine Stimulation mit TNF- α oder IFN- γ + TNF- α zu reagieren, da sie eine wesentlich höhere Freisetzung von Zytokinen pro cm² konfluentem Zellrasen zeigten. Nach 24-stündiger Stimulation mit TNF- α oder IFN- γ + TNF- α blieb trotz erniedrigter TER-Werte eine Diffusionsbarriere für die sekundären inflammatorischen Mediatoren sVCAM-1 und RANTES bestehen. Beide wurden ausschließlich von HPMEC gebildet und wurden nach basolateraler Stimulation auch nur im basolateralen Medium gemessen. Ob nach 48-stündiger Stimulation, bei der sich deutlich erniedrigte TER-Werte nach Stimulation mit IFN- γ + TNF- α zeigten, die Diffusions-

barriere weiter bestehen bleibt, muss noch untersucht werden. Obwohl sich die TER-Werte beider Bilayer-Ko-Kulturen enorm unterschieden, scheint bei beiden eine dichte epitheliale Barriere aufgebaut worden zu sein. Diese Barriere war zumindest für die eindeutig von HPMEC (im unteren Well, basolateral) produzierten inflammatorischen Mediatoren RANTES und sVCAM-1 auch nach Stimulation undurchlässig, da sie nie im *contralateralen* Kompartiment (im oberen Well, apikal) nachweisbar waren.

Im Wesentlichen ähnelten die Muster der produzierten Zytokine der Bilayer-Ko-Kultur von NCI H441/HPMEC denen der Bilayer-Ko-Kultur der Primärzellen (hATII (P0)/HPMEC). Bei der apikalen Stimulation der hATII Zellen (P0) in Bilayer-Ko-Kultur war jedoch im oberen Well (apikal) eine signifikante Sekretion von IL-6 und MCP-1 nach Stimulation mit TNF- α bzw. IFN- γ + TNF- α nachweisbar, die bei der Bilayer-Ko-Kultur der NCI H441/HPMEC nicht induziert werden konnte. Eine Freisetzung von IL-6 und MCP-1 nach Stimulation wurde bereits für 3-4 Tage alte primär isolierte humane Alveolarepithelzellen (Witherden et al., 2004) und zu hATI-ähnlichen Zellen transdifferenzierten humane Alveolarepithelzellen in Mono-Kultur beschrieben (Rosseau et al., 2000). Da die hATII Zellen in P0 in Primärkultur rasch transdifferenzieren, müsste für die Ko-Kultur der Primärzellen genauer untersucht werden, welcher Phänotyp der Alveolarepithelzellen (hATII oder hATI-ähnlich) zur Zeit der Stimulation vorlag. Der positive Nachweis von TTF-1 zum Stimulationszeitpunkt an Tag 7 weist auf die noch vorhandenen hATII-Eigenschaften der Alveolarepithelzellen in Bilayer-Ko-Kultur mit HPMEC hin. Die hohe Freisetzung von sICAM-1 lässt vermuten, dass an Tag 10 der Bilayer-Ko-Kultur vermehrt ein hATI-ähnlicher Phänotyp ausgebildet wurde.

Die Isolation einer Reinkultur von hATII Zellen durch positive Selektion mit CD44v6-Beads konnte bereits zeigen, dass die getrennten CD44v6⁺ hATII* in serumfreiem Medium in P2 in der Lage sind, IL-6 und geringe Mengen MCP-1 nach Stimulation zu produzieren. Es könnten durchaus Unterschiede in der Freisetzung sekundärer inflammatorischer Mediatoren bei hATII und hATI Zellen bestehen. Um diese Unterschiede zu untersuchen, müsste es in Kultur gelingen, hATII und hATI-ähnliche Zellen zu trennen und diese möglichst früh, d.h. in P0 oder P1, auf eine Freisetzung von MCP-1 zu prüfen. Obwohl die hohe Freisetzung von sICAM-1 seitens der Alveolarepithelzellen in P0 einen ATI-ähnlichen Phänotyp in Primärzell-Ko-Kultur vermuten lässt, konnte im oberen Well (apikal, oberhalb der Epithelzellen) eindeutig keine Sekretion von sVCAM-1 und RANTES nach Stimulation nachgewiesen werden. Demnach scheinen auch transdifferenzierte hATI-ähnliche Zellen kein sVCAM-1 und RANTES zu produzieren. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen wurde eine geringe basale Expression von RANTES bei transdifferenzierten humanen Typ I-ähnlichen Alveolarepithelzellen (Rosseau et al., 2000) sowie in 2 von 6 Isolaten von 3-4 Tage alten humanen ATII Zellen in P0 (Witherden et al., 2004) beschrieben. Wie bereits im Kapitel 4.5 erwähnt, kann diese gemessene Freisetzung von RANTES bei nicht weiter aufgereinigten Primärkulturen auch von kontaminierenden Endothel- bzw. bronchialen Epithelzellen stammen.

4.10 Methodenkritik und Ausblick

Wegen der problematischen Verfügbarkeit und der individuellen Variationsbreite biologischer Parameter bei Primärzellen war es Ziel dieser Arbeit, ein reproduzierbares *in vitro* Modell einer humanen respiratorischen Einheit aufzubauen. Humane Zell-Linien mit Eigenschaften von Typ I Alveolarepithelzellen sind bisher nicht bekannt. Demgegenüber zeigen einige Adenokarzinom Zell-Linien der Lunge Eigenschaften von Typ II Alveolarepithelzellen. Ein *in vitro* Ko-Kultur Modell einer mikrovaskulären Endothelzell-Linie mit einer Epithelzell-Linie, die Eigenschaften von Typ II Zellen hat, mag das alveoläre Epithel mit Alveolarepithelzellen vom Typ II und Typ I nicht komplett nachahmen. Es ermöglicht jedoch das Studium der Interaktion von zwei für die Integrität der alveolo-kapillären Einheit essentiellen Zelltypen, den Alveolarepithelzellen vom Typ II und den mikrovaskulären Endothelzellen. Eine Veränderung bzw. Schädigung von Typ II Alveolarepithelzellen kann als prognostischer Marker für die Integrität des Alveolarraums dienen, da eine Veränderung dieses Zelltyps Einfluss auf die Regeneration von Typ I Zellen hat. Außerdem sind beide, Alveolarepithelzellen vom Typ II und mikrovaskulären Endothelzellen, metabolisch und inflammatorisch aktiv und sind durch die Aufrechterhaltung der alveolo-kapillären Barriere wichtige Zielzellen bei pathophysiologischen, toxikologischen oder auch pharmakologischen Fragestellungen.

Zusätzlich zur allgemein bekannten problematischen Verfügbarkeit sowie der individuellen Variationsbreite primär isolierter Zellen, sind besonders für primär kultivierte respiratorische Epithelien die Kulturbedingungen und die Grenzen der Aufrechterhaltung des spezifischen Phänotyps exakt zu definieren, um relevante Aussagen zu deren Reaktionsprofil machen zu können. Um für die Ko-Kulturen der Primärzellen einschätzen zu können, ob eher ein hATII Phänotyp oder ein hATI-ähnlicher Phänotyp vorherrscht, wäre eine genaue zeitliche Analyse des Phänotyps der Alveolarepithelzellen im Verlaufe der Ko-Kultur für weitere Experimente von Nutzen. Ob definierte Eigenschaften des zu untersuchenden Zelltyps erhalten bleiben, sollte auch in Zukunft zu jeder individuellen Fragestellung für die Zell-Linien vergleichend mit den Primärzellen untersucht werden.

Im Rahmen einer akuten Lungenschädigung werden nicht nur inflammatorische Zytokine freigesetzt, sondern zusätzliche Faktoren wie Lipidmediatoren, Komplementprodukte, Sauerstoff-metabolite, NO, Proteasen und Antiproteasen tragen ebenfalls zur Schädigung der alveolo-kapillären Barriere bei. In diesem Zusammenhang spielen Alveolarmakrophagen, die als erste Abwehr im Alveolarraum inhalierte Fremdkörper phagozytieren und dabei mit einer Freisetzung verschiedenster Mediatoren reagieren, eine wichtige Rolle. Ko-Kulturen von Alveolarmakrophagen oder Monozyten aus peripherem Blut mit A549 werden häufig als Modellsysteme für inflammatorische Vorgänge bei einer akuten Lungenschädigung verwendet (Krakauer, 2002; Hjort et al., 2003; Lee et al., 2004; Wottrich et al., 2004; Rothen-Rutishauser et al., 2005). Tripel-Kulturen, bestehend aus einer Ko-Kultur der etablierten alveolo-kapillären Barriere mit Alveolarmakrophagen oder Monozyten stellen daher einen weiteren Schritt zur Verwirklichung eines *in vitro* Modells dar, das die *in vivo* Situation der Alveole möglichst exakt nachahmt.

5 Zusammenfassung

Aufgrund ihrer großen Oberfläche, ihrer Barrierefunktion und der synthetischen Aktivität der beteiligten Zelltypen ist die alveolo-kapilläre Einheit das funktionell wichtigste Element der Lunge und damit häufig Ort akuter Lungenschäden. Das Alveolarepithel spielt eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der alveolären Barriere und der pulmonalen Surfactantproduktion. Das Endothel hält die semipermeable Barriere zum Gefäßlumen aufrecht und ist ein wesentlicher Vermittler inflammatorischer Signale. Wenn diese Eigenschaften im Rahmen einer akuten Lungenschädigung bzw. eines Lungenversagens beeinträchtigt sind, kann es zum Lungenödem bis zum Verlust der respiratorischen Funktionen kommen. Aussagen zur Bedeutung einzelner Zelltypen bei einer akuten Lungenschädigung werden durch den komplexen Aufbau des Lungengewebes erschwert. *In vitro* Zellkulturmodelle spezifischer Zelltypen des Lungengewebes unterstützen die Aufklärung molekularer Ursachen schädigender Einflüsse und tragen so zum Verständnis der Pathogenese von Lungenschäden bei. Ziel der Promotionsarbeit war daher die Etablierung einer humanen distalen respiratorischen Einheit zur Untersuchung von Wirkmechanismen einer akuten Lungenschädigung.

Um die räumliche Anordnung der *in vivo* Situation der alveolo-kapillären Einheit nachzuahmen, wurde als Ko-Kulturmodell eine Kultur humaner Alveoloarepithelzellen vom Typ II (hATII Zellen) mit mikrovaskulären Endothelzellen auf den beiden Seiten einer mikroporösen Filtermembran (Bilayer) gewählt. Als Testsystem für Mehrfachbestimmungen wurde die Bilayer-Ko-Kultur an ein 24-Well Filtersystem, HTS 24-Transwell Filter Platte, angepasst. Ein Kriterium für die Differenzierung war der Aufbau einer intakten Barriere mit ausgeprägten Zell-Zell-Kontakten, die im Verlaufe der Kultur über die Messung der „Transbilayer Electrical Resistance“ (TER) und die Markierung von Proteinen der *Tight* und *Adherens Junctions* nachgewiesen wurde. Zunächst wurden verschiedene hATII-ähnliche Epithelzell-Linien (A549, NCI H441, NCI H820) mit der endothelialen Zell-Linie ISO-HAS-1 ko-kultiviert. ISO-HAS-1 zeigten konstitutive wie induzierbare phänotypische Merkmale, welche denen primär isolierter humaner pulmonaler Endothelzellen (HPMEC) ähnlich waren. Darüber hinaus wurde die Ko-Kultur der epithelialen Zell-Linien mit HPMEC etabliert und vergleichend analysiert. Dazu wurde der Einfluss des Glukokortikoids Dexamethason auf die Ausbildung einer funktionellen Barriere mittels Immunfluoreszenz, Elektronenmikroskopie und Transport-Experimenten untersucht.

Ein differenzierter Monolayer von NCI H441 mit ausgeprägten Zell-Zell-Kontakten konnte in Bilayer-Ko-Kultur mit ISO-HAS-1 oder HPMEC durch die Zugabe von Dexamethason (1 μ M) unter Verwendung eines serumhaltigen Mediums induziert werden. Auf diese Weise wurde eine von Tag 10 bis Tag 12 phänotypisch stabile Ko-Kultur mit TER-Werten um $500 \Omega \times \text{cm}^2$ erhalten, die einem intermediär dichten Epithel entsprachen. Der Aufbau eines polarisierten epithelialen Monolayers mit apikal-basolateraler Differenzierung und typischen Zell-Zell-Verbindungen konnte mittels Transmissionselektronenmikroskopie gezeigt werden. NCI H441 zeigten konstitutive wie induzierbare biochemische Merkmale, die denen primär kultivierter hATII Zellen ähnelten. Die TER-Werte der Bilayer-Ko-Kulturen der Zell-Linie NCI H441 waren jedoch deutlich niedriger als die TER-Werte der Bilayer-Ko-Kulturen primär isolierter hATII Zellen mit HPMEC

(> 1000 $\Omega \times \text{cm}^2$). Zudem exprimierten die NCI H441 ein für bronchiale Clarazellen spezifisches Protein (CC-10). Die Zell-Linie NCI H441 scheint Eigenschaften der nah verwandten hAII Zellen und Clarazellen zu vereinen. Im Hinblick auf die Freisetzung der sekundären Immunmediatoren IL-8 und MCP-1 und die fehlende Freisetzung von RANTES nach Stimulation waren NCI H441 den hAII Zellen ähnlicher als die häufig als hAII-analog eingesetzte Zell-Linie A549. Mit der Expression von RANTES und VCAM-1, die von hAII Zellen nicht gebildet wurden, wiesen A549 immunmodulatorische Eigenschaften von Bronchialzellen auf. Außerdem erfüllten A549 ein wichtiges Kriterium der alveolaren Grenzschicht nicht, sie bildeten trotz zahlreicher Variationen der Kulturbedingungen keine dichte epitheliale Barriere mit intakten Zell-Zell-Verbindungen aus. Die dritte epitheliale Zell-Linie NCI H820 verlor in serumhaltigen Medium viele Eigenschaften von AII Zellen und wurde daher, trotz hoher TER-Werte um 1000 $\Omega \times \text{cm}^2$ in Mono-Kultur, für die Ko-Kultur nicht weiter berücksichtigt.

Eine Ko-Kultur humaner Primärzellen, hAII Zellen und HPMEC, wurde in dieser Arbeit erstmals erfolgreich als Bilayer etabliert. Dabei war der Einsatz primärer hAII Zellen direkt nach der Isolation (in P0) notwendig. Um einen Monolayer der Alveolarepithelzellen aufrecht zu erhalten, musste Serum im Kulturmedium verwendet werden, das wiederum die Transdifferenzierung der hAII Zellen zu ATI-ähnlichen Zellen begünstigte. Morphologisch zeigte die Bilayer-Ko-Kultur der Primärzellen nach 7 bis 10 Tagen alveoläre Epithelzellen mit AII- und ATI-ähnlichen Phänotypen und TER-Werten von 1800-2600 $\Omega \times \text{cm}^2$. Dabei waren die TER-Werte der Bilayer-Ko-Kulturen stets um ca. 300-500 $\Omega \times \text{cm}^2$ höher als die TER-Werte der entsprechenden Mono-Kulturen der Alveolarepithelzellen. Diese erhöhten TER-Werte der Bilayer-Ko-Kultur wiesen auf die Existenz von zwei separaten Barrieren, einer endothelialen und epithelialen Barriere, hin.

In einer funktionellen Studie wurden die Eigenschaften ko-kultivierter Primärzellen nach Stimulation mit Zytokinen mit denen ko-kultivierter NCI H441 mit HPMEC vergleichend analysiert. Dabei reagierten die primären Bilayer-Ko-Kulturen wie die Zell-Linien mit einer Reduktion der TER-Werte nach Stimulation mit TNF- α und TNF- α + IFN- γ , jedoch zeitverzögert. Desweiteren zeigten beide Ko-Kulturen ein ähnliches Expressionsmuster nach basolateraler bzw. apikaler Stimulation. Eine Aktivierung von epithelialer bzw. endothelialer Seite konnte eindeutig unterschieden werden, da die Endothelzellen nach Stimulation mit einer wesentlich höheren Freisetzung sekundärer Immunmediatoren reagierten als die Epithelzellen.

Mit zwei funktionellen Barrieren *in vitro* ahmt das entwickelte Ko-Kulturmodell den Aufbau der alveolo-kapillären Einheit *in vivo* nach. Dadurch ermöglicht es Untersuchungen an zwei getrennten Kompartimenten: dem apikalen Kompartiment, das dem alveolären Lumen entspricht, und dem basolateralen Kompartiment, das dem vaskulären Lumen entspricht. Durch die Ausbildung einer dichten epithelialen Barriere, die bei den bisher beschriebenen Ko-Kulturmodellen mit A549 Zellen nicht gezeigt wurde, scheinen die in dieser Arbeit entwickelten Ko-Kulturmodelle der Zell-Linien NCI H441 mit ISO-HAS-1 bzw. HPMEC besser geeignet, bestimmte Aspekte einer akuten Lungenschädigung an einer intakten alveolo-kapillären Barriere *in vitro* zu untersuchen, als dies bisher möglich war.

6 Literaturverzeichnis

- Abraham, V., M.L. Chou, K.M. DeBolt, und M. Koval (1999) Phenotypic control of gap junctional communication by cultured alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 276:L825-834.
- Adams, R., S. Planchon, und J. Roche (1993) IFN-gamma modulation of epithelial barrier function. Time course, reversibility, and site of cytokine binding. *J Immunol.* 150:2356-2363.
- Adamson, I., und D. Bowden (1975) Derivation of type 1 epithelium from type 2 cells in the developing rat lung. *Lab Invest.* 32:736-745.
- Adamson, I.Y., und L. Young (1996) Alveolar type II cell growth on a pulmonary endothelial extracellular matrix. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 270:L1017-1022.
- Adamson, I.Y., L. Young, und J. Bakowska (1997) Enhanced alveolar type II cell growth on a pulmonary extracellular matrix over fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 272:L413-417.
- Adson, A., T.J. Raub, P.S. Burton, C.L. Barsuhn, A.R. Hilgers, K.L. Audus, und N.F. Ho (1994) Quantitative approaches to delineate paracellular diffusion in cultured epithelial cell monolayers. *J Pharm Sci.* 83:1529-1536.
- Ahdieh, M., T. Vandenbos, und A. Youakim (2001) Lung epithelial barrier function and wound healing are decreased by IL-4 and IL-13 and enhanced by IFN-gamma. *Am J Physiol Cell Physiol.* 281:C2029-2038.
- Al-Bazzaz, F.J., und C. Gailey (2001) Ion transport by sheep distal airways in a miniature chamber. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 281:L1028-1010.
- Albelda, S., P. Oliver, L. Romer, und C. Buck (1990) EndoCAM: a novel endothelial cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol.* 110:1227-1237.
- Alcorn, J.L., M.E. Smith, J.F. Smith, L.R. Margraf, und C.R. Mendelson (1997) Primary Cell Culture of Human Type II Pneumonocytes: Maintenance of a Differentiated Phenotype and Transfection with Recombinant Adenoviruses. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 17:672-682.
- Amenta, P.S., J. Gil, und A. Martinez-Hernandez (1988) Connective tissue of rat lung. II: Ultrastructural localization of collagen types III, IV, and VI. *J Histochem Cytochem.* 36:1167-1173.
- Anderson, J.M., und C.M. Van Itallie (1995) Tight junctions and the molecular basis for regulation of paracellular permeability. *Am J Physiol.* 269:G467-475.
- Ando-Akatsuka, Y., S. Yonemura, M. Itoh, M. Furuse, und S. Tsukita (1999) Differential behavior of E-cadherin and occludin in their colocalization with ZO-1 during the establishment of epithelial cell polarity. *J Cell Physiol.* 179:115-125.
- Antonetti, D., E. Wolpert, L. DeMaio, N. Harhaj, und R.J. Scaduto (2002) Hydrocortisone decreases retinal endothelial cell water and solute flux coincident with increased content and decreased phosphorylation of occludin. *J Neurochem.* 80:667-677.
- Bachofen, M., und E. Weibel (1977) Alterations of the gas exchange apparatus in adult respiratory insufficiency associated with septicemia. *Am Rev Respir Dis.* 116:589-615.
- Baggiolini, M., B. Dewald, und B. Moser (1997) Human Chemokines: An Update. *Annu Rev Immunol.* 15:675-705.
- Bajorath, J., B. Greenfield, S.B. Munro, A.J. Day, und A. Aruffo (1998) Identification of CD44 Residues Important for Hyaluronan Binding and Delineation of the Binding Site. *J Biol Chem.* 273:338-343.
- Balis, J.U., S.D. Bumgarner, J.E. Paciga, J.F. Paterson, und S.A. Shelley (1984) Synthesis of lung surfactant-associated glycoproteins by A549 cells: description of an in vitro model for human type II cell dysfunction. *Exp Lung Res.* 6:197-213.
- Banerji, S., A.J. Day, J.D. Kahmann, und D.G. Jackson (1998) Characterization of a Functional Hyaluronan-Binding Domain from the Human CD44 Molecule Expressed in Escherichia coli. *Protein Expression and Purification.* 14:371-381.
- Barton, W.W., S. Wilcoxon, P.J. Christensen, und R. Paine (1995) Disparate cytokine regulation of ICAM-1 in rat alveolar epithelial cells and pulmonary endothelial cells in vitro. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 269:L127-135.

- Bates, S.R., L.W. Gonzales, J.-Q. Tao, P. Rueckert, P.L. Ballard, und A.B. Fisher (2002) Recovery of rat type II cell surfactant components during primary cell culture. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 282:L267-276.
- Bayat, S., D. Anglade, A. Menaouar, J. Martiel, J. Lafond, G. Benchetrit, und F. Grimbert (2000a) In vivo measurement of lung capillary-alveolar macromolecule permeability by saturation bronchoalveolar lavage. *Crit Care Med.* 28:2937-2942.
- Bayat, S., D. Anglade, A. Menaouar, J.L. Martiel, J.L. Lafond, G. Benchetrit, und F.A. Grimbert (2000b) In vivo measurement of lung capillary-alveolar macromolecule permeability by saturation bronchoalveolar lavage. *Crit Care Med.* 28:2937-2942.
- Beck, G., B. Yard, A. Breedijk, K. Van Ackern, und F. Van Der Woude (1999) Release of CXC-chemokines by human lung microvascular endothelial cells (LMVEC) compared with macrovascular umbilical vein endothelial cells. *Clin Exp Immunol.* 118:298-303.
- Beekhuizen, H., E.M. Verdegaal, I. Blokland, und R. van Furth (1992) Contribution of ICAM-1 and VCAM-1 to the morphological changes in monocytes bound to human venous endothelial cells stimulated with recombinant interleukin-4 (rIL-4) or rIL-1 alpha. *Immunology.* 77:469-472.
- Berger, J.T., J.A. Voynow, K.W. Peters, und M.C. Rose (1999) Respiratory Carcinoma Cell Lines . MUC Genes and Glycoconjugates. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 20:500-510.
- Berkman, N., M. John, G. Roesems, P. Jose, P.J. Barnes, und K.F. Chung (1996) Interleukin 13 inhibits macrophage inflammatory protein-1 alpha production from human alveolar macrophages and monocytes. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 15:382-389.
- Berrios, J.C., M.A. Schroeder, und R.D. Hubmayr (2001) Mechanical properties of alveolar epithelial cells in culture. *J Appl Physiol.* 91:65-73.
- Bhatia, M., und S. Moochhala (2004) Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. *J Pathol.* 202:145-156.
- Bingle, L., T. Bull, B. Fox, A. Guz, R. Richards, und T. Tetley (1990) Type II pneumocytes in mixed cell culture of human lung: a light and electron microscopic study. *Environ Health Perspect.* 85:71-80.
- Birkness, K.A., M. Deslauriers, J.H. Bartlett, E.H. White, C.H. King, und F.D. Quinn (1999) An In Vitro Tissue Culture Bilayer Model To Examine Early Events in Mycobacterium tuberculosis Infection. *Infect Immun.* 67:653-658.
- Birukova, A.A., K.G. Birukov, B. Gorshkov, F. Liu, J.G.N. Garcia, und A.D. Verin (2005) MAP kinases in lung endothelial permeability induced by microtubule disassembly. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*:Article online in advance of print.
- Blau, H., S. Riklis, V. Kravtsov, und M. Kalina (1994) Secretion of cytokines by rat alveolar epithelial cells: possible regulatory role for SP-A. *Am J Physiol.* 266:L148-155.
- Blennerhassett, J.B. (1985) Shock lung and diffuse alveolar damage pathological and pathogenetic considerations. *Pathology.* 17:239-247.
- Boggaram, V., M. Smith, und C. Mendelson (1989) Regulation of expression of the gene encoding the major surfactant protein (SP-A) in human fetal lung in vitro. Disparate effects of glucocorticoids on transcription and on mRNA stability. *J Biol Chem.* 264:11421-11427.
- Bohinski, R., R. Di Lauro, und J. Whitsett (1994) The lung-specific surfactant protein B gene promoter is a target for thyroid transcription factor 1 and hepatocyte nuclear factor 3, indicating common factors for organ-specific gene expression along the foregut axis. *Mol Cell Biol.* 14:5671-5681.
- Borok, Z., S. Danto, S. Zabski, und E. Crandall (1994) Defined medium for primary culture de novo of adult rat alveolar epithelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 30A:99-104.
- Borok, Z., A. Hami, S. Danto, S. Zabski, und E. Crandall (1995) Rat serum inhibits progression of alveolar epithelial cells toward the type I cell phenotype in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 12:50-561.
- Borok, Z., A. Hami, S.I. Danto, R.L. Lubman, K.J. Kim, und E.D. Crandall (1996) Effects of EGF on alveolar epithelial junctional permeability and active sodium transport. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 270:L559-565.

- Borok, Z., J.M. Liebler, R.L. Lubman, M.J. Foster, B. Zhou, X. Li, S.M. Zabski, K.-J. Kim, und E.D. Crandall (2002) Alveolar Epithelial Ion and Fluid Transport: Na transport proteins are expressed by rat alveolar epithelial type I cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 282:L599-608.
- Borok, Z., R.L. Lubman, S.I. Danto, X.-L. Zhang, S.M. Zabski, L.S. King, D.M. Lee, P. Agre, und E.D. Crandall (1998) Keratinocyte Growth Factor Modulates Alveolar Epithelial Cell Phenotype In Vitro: Expression of Aquaporin 5. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 18:554-561.
- Boyer, B., A. Valles, G. Tucker, A. Delouvee, und J. Thiery (1993) Involvement of cell motility in tumor progression. *Symp Soc Exp Biol.* 47:183-195.
- Braga, V.M.M. (2002) Cell-cell adhesion and signalling. *Current Opinion in Cell Biology.* 14:546-556.
- Brasch, F., G. Johnen, A. Winn-Brasch, S.H. Guttentag, A. Schmiedl, N. Kapp, Y. Suzuki, K.M. Muller, J. Richter, S. Hawgood, und M. Ochs (2004) Surfactant protein B in type II pneumocytes and intra-alveolar surfactant forms of human lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 30:449-458.
- Brown, Z., M.E. Gerritsen, W.W. Carley, R.M. Strieter, S.L. Kunkel, und J. Westwick (1994) Chemokine gene expression and secretion by cytokine-activated human microvascular endothelial cells. Differential regulation of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 in response to interferon-gamma. *Am J Pathol.* 145:913-921.
- Bruewer, M., A. Luegering, T. Kucharzik, C.A. Parkos, J.L. Madara, A.M. Hopkins, und A. Nusrat (2003) Proinflammatory Cytokines Disrupt Epithelial Barrier Function by Apoptosis-Independent Mechanisms. *J Immunol.* 171:6164-6172.
- Bruno, M.D., R.J. Bohinski, K.M. Huelsman, J.A. Whitsett, und T.R. Korfhagen (1995) Lung cell-specific expression of the murine surfactant protein A (SP-A) gene is mediated by interactions between the SP-A promoter and thyroid transcription factor-1. *J Biol Chem.* 270:6531-6536.
- Buergelt, C.D. (1995) Interstitial pneumonia in the horse: a fledgling morphological entity with mysterious causes. *Equine Vet J.* 27:4-5.
- Burg, J., V. Krump-Konvalinkova, F. Bittinger, und C.J. Kirkpatrick (2002) GM-CSF expression by human lung microvascular endothelial cells: in vitro and in vivo findings. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 283:L460-467.
- Burke-Gaffney, A., und P. Hellewell (1996) Tumour necrosis factor-alpha-induced ICAM-1 expression in human vascular endothelial and lung epithelial cells: modulation by tyrosine kinase inhibitors. *Br J Pharmacol.* 119:1149-1158.
- Burns, A., F. Takei, und C. Doerschuk (1994) Quantitation of ICAM-1 expression in mouse lung during pneumonia. *J Immunol.* 153:3189-3198.
- Buse, P., P.L. Woo, D.B. Alexander, A. Reza, und G.L. Firestone (1995) Glucocorticoid-induced Functional Polarity of Growth Factor Responsiveness Regulates Tight Junction Dynamics in Transformed Mammary Epithelial Tumor Cells. *J Biol Chem.* 270:28223-28227.
- Campbell, L., A.-N.G. Abulrob, L.E. Kandalaf, S. Plummer, A.J. Hollins, A. Gibbs, und M. Gumbleton (2003) Constitutive Expression of P-Glycoprotein in Normal Lung Alveolar Epithelium and Functionality in Primary Alveolar Epithelial Cultures. *J Pharmacol Exp Ther.* 304:441-452.
- Campbell, L., A.J. Hollins, A. Al-Eid, G.R. Newman, C. von Ruhland, und M. Gumbleton (1999) Caveolin-1 expression and caveolae biogenesis during cell transdifferentiation in lung alveolar epithelial primary cultures. *Biochem Biophys Res Commun.* 262:744-751.
- Carlos, T., und J. Harlan (1994) Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood.* 84:2068-2101.
- Carolan, E.J., D.A. Mower, und T.B. Casale (1997) Cytokine-induced Neutrophil Transepithelial Migration Is Dependent upon Epithelial Orientation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 17:727-732.
- Carterson, A.J., K. Honer zu Bentrup, C.M. Ott, M.S. Clarke, D.L. Pierson, C.R. Vanderburg, K.L. Buchanan, C.A. Nickerson, und M.J. Schurr (2005) A549 lung epithelial cells grown as three-dimensional aggregates: alternative tissue culture model for *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Infect Immun.* 73:1129-1140.
- Casale, T.B., und E.J. Carolan (1999) Cytokine-induced sequential migration of neutrophils through endothelium and epithelium. *Inflammation Research.* 48:22-27.

- Cassel, T.N., J.-A. Gustafsson, and M. Nord (2000) CYP2B1 Is Regulated by C/EBP[alpha] and C/EBP[delta] in Lung Epithelial Cells. *Molecular Cell Biology Research Communications*. 3:42-47.
- Cereijido, M., L. Shoshani, and R.G. Contreras (2000) Molecular Physiology and Pathophysiology of Tight Junctions I. Biogenesis of tight junctions and epithelial polarity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 279:G477-482.
- Chang, Y.S., L.L. Munn, M.V. Hillsley, R.O. Dull, J. Yuan, S. Lakshminarayanan, T.W. Gardner, R.K. Jain, and J.M. Tarbell (2000) Effect of Vascular Endothelial Growth Factor on Cultured Endothelial Cell Monolayer Transport Properties. *Microvascular Research*. 59:265-277.
- Cheek, J.M., M.J. Evans, and E.D. Crandall (1989) Type I cell-like morphology in tight alveolar epithelial monolayers. *Exp Cell Res* 1989. 184:375-387.
- Chen, J., Z. Chen, T. Narasaraju, N. Jin, and L. Liu (2004) Isolation of highly pure alveolar epithelial type I and type II cells from rat lungs. *Lab Invest*. 84:727-735.
- Chess, P.R., L. Toia, and J.N. Finkelstein (2000) Mechanical strain-induced proliferation and signaling in pulmonary epithelial H441 cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 279:L43-51.
- Christensen, P.J., S. Kim, R.H. Simon, G.B. Toews, and R. Paine, 3rd (1993) Differentiation-related expression of ICAM-1 by rat alveolar epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 8:9-15.
- Chung, K.Y., S.H. Kim, I.H. Kwon, Y.S. Choi, T.W. Noh, T.J. Kwon, and D.H. Shin (2002) Clinicopathologic review of pulmonary silicone embolism with special emphasis on the resultant histologic diversity in the lung—a review of five cases. *Yonsei Med J*. 43:152-159.
- Clark, J.G., C. Kuhn, 3rd, J.A. McDonald, and R.P. Mecham (1983) Lung connective tissue. *Int Rev Connect Tissue Res*. 10:249-331.
- Claude, P. (1978) Morphological factors influencing transepithelial permeability: a model for the resistance of the zonula occludens. *J Membr Biol*. 39:219-232.
- Corada, M., M. Mariotti, G. Thurston, K. Smith, R. Kunkel, M. Brockhaus, M.G. Lampugnani, I. Martin-Padura, A. Stoppacciaro, L. Ruco, D.M. McDonald, P.A. Ward, and E. Dejana (1999) Vascular endothelial-cadherin is an important determinant of microvascular integrity in vivo. *PNAS*. 96:9815-9820.
- Cordenonsi, M., F. D'Atri, E. Hammar, D.A.D. Parry, J. Kendrick-Jones, D. Shore, and S. Citi (1999) Cingulin Contains Globular and Coiled-coil Domains and Interacts with ZO-1, ZO-2, ZO-3, and Myosin. *J Cell Biol*. 147:1569-1582.
- Corroyer, S., E. Nabeyrat, and A. Clement (1997) Involvement of the Cell Cycle Inhibitor CIP1/WAF1 in Lung Alveolar Epithelial Cell Growth Arrest Induced by Glucocorticoids. *Endocrinology*. 138:3677-3685.
- Cott, G., S. Walker, and R. Mason (1987) The effect of substratum and serum on the lipid synthesis and morphology of alveolar type II cells in vitro. *Exp Lung Res*. 13:427-447.
- Coyne, C.B., M.K. Vanhook, T.M. Gambling, J.L. Carson, R.C. Boucher, and L.G. Johnson (2002) Regulation of Airway Tight Junctions by Proinflammatory Cytokines. *Mol. Biol. Cell*. 13:3218-3234.
- Crapo, J., B. Barry, P. Gehr, M. Bachofen, and E. Weibel (1982) Cell number and cell characteristics of the normal human lung. *Am Rev Respir Dis*. 126:332-337.
- Crestani, B., P. Cornillet, M. Dehoux, C. Rolland, M. Guenounou, and M. Aubier (1994) Alveolar type II epithelial cells produce interleukin-6 in vitro and in vivo. Regulation by alveolar macrophage secretory products. *J Clin Invest*. 94:731-740.
- Creuwels, L., L. van Golde, and H. Haagsman (1997) The pulmonary surfactant system: biochemical and clinical aspects. *Lung*. 175:1-39.
- Crouch, E.C. (1998) Collectins and Pulmonary Host Defense. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 19:177-201.
- Cunningham, A., and J. Kirby (1995) Regulation and function of adhesion molecule expression by human alveolar epithelial cells. *Immunology*. 86:279-286.
- Cunningham, A., D. Milne, J. Wilkes, J. Dark, T. Tetley, and J. Kirby (1994) Constitutive expression of MHC and adhesion molecules by alveolar epithelial cells (type II pneumocytes) isolated from human lung and comparison with immunocytochemical findings. *J Cell Sci*. 107:443-449.

- Dagenais, A., C. Denis, M.-F. Vives, S. Girouard, C. Masse, T. Nguyen, T. Yamagata, C. Grygorczyk, R. Kothary, and Y. Berthiaume (2001) Modulation of $\{\alpha\}$ -ENaC and $\{\alpha\}$ 1-Na⁺-K⁺-ATPase by cAMP and dexamethasone in alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 281:L217-230.
- Danto, S., J. Shannon, Z. Borok, S. Zabski, and E. Crandall (1995) Reversible transdifferentiation of alveolar epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 12:497-561.
- Dejana, E., M. Corada, and M. Lampugnani (1995) Endothelial cell-to-cell junctions. *FASEB J.* 9:910-918.
- Dejana, E., M. Lampugnani, O. Martinez-Estrada, and G. Bazzoni (2000) The molecular organization of endothelial junctions and their functional role in vascular morphogenesis and permeability. *Int J Dev Biol.* 44:743-748.
- Dempo, K., M. Satoh, S. Tsuji, M. Mori, Y. Kuroki, and T. Akino (1987) Immunohistochemical studies on the expression of pulmonary surfactant apoproteins in human lung carcinomas using monoclonal antibodies. *Pathol Res Pract.* 182:669-675.
- Diglio, C., and Y. Kikkawa (1977) The type II epithelial cells of the lung. IV. Adaption and behavior of isolated type II cells in culture. *Lab Invest.* 37:622-631.
- Dimova, S., P.H. Hoet, and B. Nemery (2001) Xenobiotic-metabolizing enzyme activities in primary cultures of rat type II pneumocytes and alveolar macrophages. *Drug Metab Dispos.* 29:1349-1354.
- Dobbs, L., M. Williams, and A. Brandt (1985) Changes in biochemical characteristics and pattern of lectin binding of alveolar type II cells with time in culture. *Biochim Biophys Acta.* 846:155-166.
- Dobbs, L.G., R. Gonzalez, M.A. Matthay, E.P. Carter, L. Allen, and A.S. Verkman (1998) Highly water-permeable type I alveolar epithelial cells confer high water permeability between the airspace and vasculature in rat lung. *PNAS.* 95:2991-2996.
- Dobbs, L.G., R.F. Gonzalez, L. Allen, and D.K. Froh (1999) HTI56, an Integral Membrane Protein Specific to Human Alveolar Type I Cells. *J Histochem Cytochem.* 47:129-138.
- Dobbs, L.G., M.S. Pian, M. Maglio, S. Dumars, and L. Allen (1997) Maintenance of the differentiated type II cell phenotype by culture with an apical air surface. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 273:L347-354.
- Dodoo, A.N., S.S. Bansal, D.J. Barlow, F. Bennet, R.C. Hider, A.B. Lansley, M.J. Lawrence, and C. Marriott (2000) Use of alveolar cell monolayers of varying electrical resistance to measure pulmonary peptide transport. *J Pharm Sci.* 89:223-231.
- Dormans, J.A., L. van Bree, A.J. Boere, M. Marra, and P.J. Rombout (1999) Interspecies differences in time course of pulmonary toxicity following repeated exposure to ozone. *Inhal Toxicol.* 11:309-329.
- Drab, M., P. Verkade, M. Elger, M. Kasper, M. Lohn, B. Lauterbach, J. Menne, C. Lindschau, F. Mende, F.C. Luft, A. Schedl, H. Haller, and T.V. Kurzchalia (2001) Loss of Caveolae, Vascular Dysfunction, and Pulmonary Defects in Caveolin-1 Gene-Disrupted Mice. *Science.* 293:2449-2452.
- Dreyfuss, D., G. Basset, P. Soler, and G. Saumon (1985) Intermittent positive-pressure hyperventilation with high inflation pressures produces pulmonary microvascular injury in rats. *Am Rev Respir Dis.* 132:880-884.
- Dreyfuss, D., P. Soler, G. Basset, and G. Saumon (1988) High inflation pressure pulmonary edema. Respective effects of high airway pressure, high tidal volume, and positive end-expiratory pressure. *Am Rev Respir Dis.* 137:1159-1164.
- Driscoll, B., S. Buckley, K.C. Bui, K.D. Anderson, and D. Warburton (2000) Telomerase in alveolar epithelial development and repair. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 279:L1191-1198.
- Dudek, S.M., and J.G.N. Garcia (2001) Cytoskeletal regulation of pulmonary vascular permeability. *J Appl Physiol.* 91:1487-1500.
- Duguay, D., R.A. Foty, and M.S. Steinberg (2003) Cadherin-mediated cell adhesion and tissue segregation: qualitative and quantitative determinants. *Dev Biol.* 253:309-323.
- Dye, J., L. Leach, P. Clark, and J. Firth (2001) Cyclic AMP and acidic fibroblast growth factor have opposing effects on tight and adherens junctions in microvascular endothelial cells in vitro. *Microvasc Res.* 62:94-113.

- Edelson, J., J. Shannon, and R. Mason (1988) Alkaline phosphatase: a marker of alveolar type II cell differentiation. *Am Rev Respir Dis.* 138:1268-1275.
- Edelson, J., J. Shannon, and R. Mason (1989) Effects of two extracellular matrices on morphologic and biochemical properties of human type II cells in vitro. *Am Rev Respir Dis.* 140:1398-1404.
- Ehrhardt, C., C. Kneuer, J. Fiegel, J. Hanes, U.F. Schaefer, K.J. Kim, and C.M. Lehr (2002) Influence of apical fluid volume on the development of functional intercellular junctions in the human epithelial cell line 16HBE14o-: implications for the use of this cell line as an in vitro model for bronchial drug absorption studies. *Cell Tissue Res.* 308:391-400.
- Elbert, K., U. Schafer, H. Schafers, K. Kim, V. Lee, and C. Lehr (1999) Monolayers of Human Alveolar Epithelial Cells in Primary Culture for Pulmonary Absorption and Transport Studies. *Pharmaceutical Research.* 16:601-608.
- Endl, E., and J. Gerdes (2000) The Ki-67 protein: fascinating forms and an unknown function. *Exp Cell Res.* 257:231-237.
- Erasmus, J.J., H.P. McAdams, and S.E. Rossi (2002) Drug-induced lung injury. *Semin Roentgenol.* 37:72-81.
- Fanning, A.S., B.J. Jameson, L.A. Jesaitis, and J.M. Anderson (1998) The Tight Junction Protein ZO-1 Establishes a Link between the Transmembrane Protein Occludin and the Actin Cytoskeleton. *J Biol Chem.* 273:29745-29753.
- Fasano, M., M.T. Sabatini, R. Wiczorek, G. Sidhu, S. Goswami, and J. Jagirdar (1997) CD44 and its v6 spliced variant in lung tumors: a role in histogenesis? *Cancer.* 80:34-41.
- Fehrenbach, H. (2001) Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited. *Respir Res.* 2:33-46.
- Fehrenbach, H., A. Fehrenbach, T. Pan, M. Kasper, and R. Mason (2002) Keratinocyte growth factor-induced proliferation of rat airway epithelium is restricted to Clara cells in vivo. *Eur Respir J.* 20:1185-1197.
- Fehrenbach, H., M. Kasper, T. Tschernig, T. Pan, D. Schuh, J. Shannon, M. Muller, and M. R.J. (1999) Keratinocyte growth factor-induced hyperplasia of rat alveolar type II cells in vivo is resolved by differentiation into type I cells and by apoptosis. *Eur Respir J.* 14:534-544.
- Fehrenbach, H., M. Kasper, T. Tschernig, M.S. Shearman, D. Schuh, and M. Muller (1998) Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) exhibits highly differential cellular and subcellular localisation in rat and human lung. *Cell Mol Biol.* 44:1147-1157.
- Ferro, T., P. Neumann, N. Gertzberg, R. Clements, and A. Johnson (2000) Protein kinase C-alpha mediates endothelial barrier dysfunction induced by TNF-alpha. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 278:L1107-1117.
- Ferro, T.J., N. Gertzberg, L. Selden, P. Neumann, and A. Johnson (1997) Endothelial barrier dysfunction and p42 oxidation induced by TNF-alpha are mediated by nitric oxide. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 272:L979-988.
- Feuerhake, F., G. Fuchsl, R. Bals, and U. Welsch (1998a) Expression of inducible cell adhesion molecules in the normal human lung: immunohistochemical study of their distribution in pulmonary blood vessels. *Histochem Cell Biol.* 110:387-394.
- Feuerhake, F., G. Fuchsl, and U. Welsch (1998b) Immunohistologic study of the localization of ICAM-1 (intercellular cell adhesion molecule 1) in alveolar epithelium in the human lung. *Pneumologie.* 52:707-713.
- Finkelstein, J., C. Johnston, T. Barrett, and O. G. (1997) Particulate-Cell Interactions and Pulmonary Cytokine Expression. *Environ Health Perspect.* 105:1179-1182.
- Fish, S.M., R. Proujansky, and W.W. Reenstra (1999) Synergistic effects of interferon gamma and tumour necrosis factor alpha on T84 cell function. *Gut.* 45:191-198.
- Folkesson, H., M. Matthay, H. Hasegawa, F. Kheradmand, and A. Verkman (1994) Transcellular Water Transport in Lung Alveolar Epithelium Through Mercury- Sensitive Water Channels. *PNAS.* 91:4970-4974.
- Foster, K.A., M.L. Avery, M. Yazdanian, and K.L. Audus (2000) Characterization of the Calu-3 cell line as a tool to screen pulmonary drug delivery. *Int J Pharm.* 208:1-11.
- Foster, K.A., C.G. Oster, M.M. Mayer, M.L. Avery, and K.L. Audus (1998) Characterization of the A549 Cell Line as a Type II Pulmonary Epithelial Cell Model for Drug Metabolism. *Experimental Cell Research.* 243:359-366.

- Foty, R.A., und M.S. Steinberg (2004) Cadherin-mediated cell-cell adhesion and tissue segregation in relation to malignancy. *Int J Dev Biol.* 48:397-409.
- Fuchs, S., A. Hollins, M. Laue, U. Schaefer, K. Roemer, M. Gumbleton, und C. Lehr (2003) Differentiation of human alveolar epithelial cells in primary culture: morphological characterization and synthesis of caveolin-1 and surfactant protein-C. *Cell Tissue Res.* 311:31-45.
- Garlanda, C., und E. Dejana (1997) Heterogeneity of endothelial cells. Specific markers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 17:1193-1202.
- Gazdar, A., R. Linnoila, Y. Kurita, H. Oie, J. Mulshine, J. Clark, und J. Whitsett (1990) Peripheral airway cell differentiation in human lung cancer cell lines. *Cancer Res.* 50:5481-5487.
- Gearing, A.J., I. Hemingway, R. Pigott, J. Hughes, A.J. Rees, und S.J. Cashman (1992) Soluble forms of vascular adhesion molecules, E-selectin, ICAM-1, and VCAM-1: pathological significance. *Ann N Y Acad Sci.* 667:324-331.
- Gerdes, J., H. Lemke, H. Baisch, H.H. Wacker, U. Schwab, und H. Stein (1984) Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol.* 133:1710-1715.
- Gindorf, C., A. Steimer, C.M. Lehr, U. Bock, S. Schmitz, und E. Haltner (2001) Marker transport across biological barriers in vitro: comparison of cell culture models for the gastrointestinal barrier, the blood-brain barrier and the alveolar epithelium of the lung. *Altex.* 18:155-164.
- Godding, V., J. Stark, J. Sedgwick, und W. Busse (1995) Adhesion of activated eosinophils to respiratory epithelial cells is enhanced by tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 13:555-231.
- Godfrey, R. (1997) Human airway epithelial tight junctions. *Microsc Res Tech.* 38:488-499.
- Goebeler, M., T. Yoshimura, A. Toksoy, U. Ritter, E.-B. Brocker, und R. Gillitzer (1997) The Chemokine Repertoire of Human Dermal Microvascular Endothelial Cells and Its Regulation by Inflammatory Cytokines. *J Invest Dermatol.* 108:445-451.
- Goldblum, S.E., X. Ding, und J. Campbell-Washington (1993) TNF-alpha induces endothelial cell F-actin depolymerization, new actin synthesis, and barrier dysfunction. *Am J Physiol.* 264:C894-905.
- Gonzales, L.W., S.H. Guttentag, K.C. Wade, A.D. Postle, und P.L. Ballard (2002) Differentiation of human pulmonary type II cells in vitro by glucocorticoid plus cAMP. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 283:L940-951.
- Greenberg, A.K., J. Hu, S. Basu, J. Hay, J. Reibman, T. Yie, K.M. Tchou-Wong, W.N. Rom, und T.C. Lee (2002) Glucocorticoids Inhibit Lung Cancer Cell Growth through Both the Extracellular Signal-Related Kinase Pathway and Cell Cycle Regulators. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 27:320-328.
- Guan, Y., P.L. Woo, N.M. Rubenstein, und G.L. Firestone (2002) Transforming growth factor-alpha abrogates the glucocorticoid stimulation of tight junction formation and reverses the steroid-induced down-regulation of fascin in rat mammary epithelial tumor cells by a Ras-dependent pathway. *Exp Cell Res.* 273:1-11.
- Gueven, N., B. Glatthaar, H. Manke, und H. Haemmerle (1996) Co-cultivation of rat pneumocytes and bovine endothelial cells on a liquid-air interface. *Eur Respir J.* 9:968-975.
- Gumbiner, B. (1987) Structure, biochemistry, and assembly of epithelial tight junctions. *Am J Physiol Cell Physiol.* 253:C749-758.
- Gumbiner, B., B. Stevenson, und A. Grimaldi (1988) The role of the cell adhesion molecule uvomorulin in the formation and maintenance of the epithelial junctional complex. *J Cell Biol.* 107:1575-1587.
- Gumbiner, B.M. (1996) Cell Adhesion: The Molecular Basis of Tissue Architecture and Morphogenesis. *Cell.* 84:345-357.
- Gumbiner, B.M. (2000) Regulation of Cadherin Adhesive Activity. *J Cell Biol.* 148:399-404.
- Gutierrez, J.A., R.F. Gonzalez, und L.G. Dobbs (1998) Mechanical distension modulates pulmonary alveolar epithelial phenotypic expression in vitro. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 274:L196-1326.
- Hagios, C., A. Lochter, und M. Bissell (1998) Tissue architecture: the ultimate regulator of epithelial function? *Philos Trans R Soc Lond B.* 353:857-870.
- Hance, A.J., und R.G. Crystal (1975) The connective tissue of lung. *Am Rev Respir Dis.* 112:657-711.

- Haselton, P.S., and A. Curry (1996) Anatomy of the lung. pp 7-44. *In* Spencer's Pathology of the lung. P.S. Hasleton (Eds). McGraw Hill, New York.
- Hashida, R., C. Anamizu, Y. Yagyu-Mizuno, S. Ohkuma, and T. Takano (1986) Transcellular transport of fluorescein dextran through an arterial endothelial cell monolayer. *Cell Struct Funct.* 11:343-349.
- Hashimoto, S., Y. Gon, K. Matsumoto, I. Takeshita, Y. Asai, T. Machino, and T. Horie (2000) Regulation by intracellular glutathione of TNF-alpha-induced p38 MAP kinase activation and RANTES production by human pulmonary vascular endothelial cells. *Allergy.* 55:463-468.
- Hermanns, M.I. (1997). Isolierung und Kultivierung humaner pulmonaler mikrovaskulärer Endothelzellen (HP-MEC). Diplomarbeit. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der RWTH Aachen. pp 1-109.
- Hillyer, P., E. Mordet, G. Flynn, and D. Male (2003) Chemokines, chemokine receptors and adhesion molecules on different human endothelia: discriminating the tissue-specific functions that affect leucocyte migration. *Clin Exp Immunol.* 134:431-441.
- Hjort, M.R., A.J. Brenyo, J.N. Finkelstein, M.W. Frampton, M.B. LoMonaco, J.C. Stewart, C.J. Johnston, and C.T. D'Angio (2003) Alveolar epithelial cell-macrophage interactions affect oxygen-stimulated interleukin-8 release. *Inflammation.* 27:137-145.
- Hoheisel, D., T. Nitz, H. Franke, J. Wegener, A. Hakvoort, T. Tilling, and H. Galla (1998) Hydrocortisone reinforces the blood-brain properties in a serum free cell culture system. *Biochem Biophys Res Commun.* 247:312-315.
- Hopkins, A., D. Li, R. Mrsny, S. Walsh, and A. Nusrat (2000) Modulation of tight junction function by G protein-coupled events. *Adv Drug Deliv Rev.* 41:329-340.
- Houser, S.L., L.C. Benjamin, J.C. Wain, J.C. Madsen, and J.S. Allan (2004) Constitutive expression of major histocompatibility complex class II antigens in pulmonary epithelium and endothelium varies among different species. *Transplantation.* 77:605-607.
- Hu, M., X. Lin, Q. Du, E.J. Miller, P. Wang, and H.H. Simms (2005) Regulation of polymorphonuclear leukocyte apoptosis: role of lung endothelium-epithelium bilayer transmigration. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 288:L266-274.
- Hyers, T., S. Tricomi, P. Dettenmeier, and A. Fowler (1991) Tumor necrosis factor levels in serum and bronchoalveolar lavage fluid of patients with the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis.* 144:268-271.
- Ikeda, K., J.C. Clark, J.R. Shaw-White, M.T. Stahlman, C.J. Boutell, and J.A. Whitsett (1995) Gene Structure and Expression of Human Thyroid Transcription Factor-1 in Respiratory Epithelial Cells. *J Biol Chem.* 270:8108-8114.
- Ilan, N., S. Mahooti, D. Rimm, and J. Madri (1999) PECAM-1 (CD31) functions as a reservoir for and a modulator of tyrosine-phosphorylated beta-catenin. *J Cell Sci.* 112:3005-3014.
- Irwin, D.C., M.C. Tissot van Patot, A. Tucker, and R. Bowen (2005) Direct ANP inhibition of hypoxia-induced inflammatory pathways in pulmonary microvascular and macrovascular endothelial monolayers. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 288:L849-859.
- Isakson, B.E., R.L. Lubman, G.J. Seedorf, and S. Boitano (2001) Modulation of pulmonary alveolar type II cell phenotype and communication by extracellular matrix and KGF. *Am J Physiol Cell Physiol.* 281:C1291-1299.
- Isakson, B.E., G.J. Seedorf, R.L. Lubman, and S. Boitano (2002) Heterocellular cultures of pulmonary alveolar epithelial cells grown on laminin-5 supplemented matrix. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 38:443-449.
- Isakson, B.E., G.J. Seedorf, R.L. Lubman, W.H. Evans, and S. Boitano (2003) Cell-cell communication in heterocellular cultures of alveolar epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 29:552-561.
- Itani, O.A., S.D. Auerbach, R.F. Husted, K.A. Volk, S. Ageloff, M.A. Knepper, J.B. Stokes, and C.P. Thomas (2002) Alveolar Epithelial Ion and Fluid Transport: Glucocorticoid-stimulated lung epithelial Na⁺ transport is associated with regulated ENaC and sgk1 expression. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 282:L631-641.
- Iyonaga, K., M. Miyajima, M. Suga, N. Saita, and M. Ando (1997) Alterations in cytokeratin expression by the alveolar lining epithelial cells in lung tissues from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *J Pathol.* 182:217-224.

- Jeffery, P.K., und L. Reid (1975) New observations of rat airway epithelium: a quantitative and electron microscopic study. *J Anat.* 120:295-320.
- Jiang, Z., B. Woda, L. Savas, und A. Fraire (1998) Expression of ICAM-1, VCAM-1, and LFA-1 in adenocarcinoma of the lung with observations on the expression of these adhesion molecules in non-neoplastic lung tissue. *Mod Pathol.* 11:1189-1192.
- Johansson, J., und T. Curstedt (1997) Molecular structures and interactions of pulmonary surfactant components. *Eur J Biochem.* 244:675-693.
- Johnson, J., B. Meyrick, G. Jesmok, und K.L. Brigham (1989) Human recombinant tumor necrosis factor alpha infusion mimics endotoxemia in awake sheep. *J Appl Physiol.* 66:1448-1454.
- Johnson, M.D., J.H. Widdicombe, L. Allen, P. Barbry, und L.G. Dobbs (2002) Alveolar epithelial type I cells contain transport proteins and transport sodium, supporting an active role for type I cells in regulation of lung liquid homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:1966-1971.
- Kalina, M., R. Mason, und J. Shannon (1992) Surfactant protein C is expressed in alveolar type II cells but not in Clara cells of rat lung. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 6:594-600.
- Kaner, R.J., und R.G. Crystal (2004) Pathogenesis of High Altitude Pulmonary Edema: Does Alveolar Epithelial Lining Fluid Vascular Endothelial Growth Factor Exacerbate Capillary Leak? *High Altitude Medicine & Biology.* 5:399-409.
- Kang, B., J. Crapo, C. Wegner, L. Letts, und L. Chang (1993) Intercellular adhesion molecule-1 expression on the alveolar epithelium and its modification by hyperoxia. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 9:350-355.
- Kang, B., B. Manderschied, Y. Huang, J. Crapo, und L. Chang (1996) Contrasting response of lung parenchymal cells to instilled TNF alpha and IFN gamma: the inducibility of specific cell ICAM-1 in vivo. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 15:540-550.
- Karczewski, J., und J. Groot (2000) Molecular Physiology and Pathophysiology of Tight Junctions III. Tight junction regulation by intracellular messengers: differences in response within and between epithelia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 279:G660-665.
- Kasper, M., A. Bierhaus, A. Whyte, R. Binns, D. Schuh, und M. Muller (1996) Expression of CD44 isoforms during bleomycin-or radiation-induced pulmonary fibrosis in rats and mini-pigs. *Histochem Cell Biol.* 105:221-230.
- Kasper, M., U. Gunthert, P. Dall, K. Kayser, D. Schuh, G. Haroske, und M. Muller (1995a) Distinct expression patterns of CD44 isoforms during human lung development and in pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 13:648-656.
- Kasper, M., R. Koslowski, T. Luther, D. Schuh, M. Muller, und K. Wenzel (1995b) Immunohistochemical evidence for loss of ICAM-1 by alveolar epithelial cells in pulmonary fibrosis. *Histochem Cell Biol.* 104:397-405.
- Kasper, M., T. Reimann, U. Hempel, K. Wenzel, A. Bierhaus, D. Schuh, V. Dimmer, G. Haroske, und M. Muller (1998) Loss of caveolin expression in type I pneumocytes as an indicator of subcellular alterations during lung fibrogenesis. *Histochem Cell Biol.* 109:41-48.
- Kasper, M., T. Rudolf, A.A. Verhofstad, D. Schuh, und M. Muller (1993) Heterogeneity in the immunolocalization of cytokeratin-specific monoclonal antibodies in the rat lung: evaluation of three different alveolar epithelial cell types. *Histochemistry.* 100:65-71.
- Kasper, M., D. Seidel, L. Knels, N. Morishima, A. Neisser, S. Bramke, und R. Koslowski (2004) Early signs of lung fibrosis after in vitro treatment of rat lung slices with CdCl₂ and TGF-beta1. *Histochem Cell Biol.* 121:131-140.
- Kastelova, A., S. Dimova, und B. Nemery (2003) Effects of propranolol on xenobiotic enzyme activities in rat type II pneumocytes and alveolar macrophages in vivo. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 25:797-802.
- Kawada, H., J. Shannon, und R. Mason (1990) Improved maintenance of adult rat alveolar type II cell differentiation in vitro: effect of serum-free, hormonally defined medium and a reconstituted basement membrane. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 3:33-43.
- Kelly, S.E., C.J. Bachurski, M.S. Burhans, und S.W. Glasser (1996) Transcription of the Lung-specific Surfactant Protein C Gene Is Mediated by Thyroid Transcription Factor 1. *J Biol Chem.* 271:6881-6888.
- Kikkawa, Y., und K. Yoneda (1974) The type II epithelial cell of the lung. I. Method of isolation. *Lab Invest.* 30:76-84.

- Kim, K.-J., und A.B. Malik (2003) Protein transport across the lung epithelial barrier. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 284:L247-259.
- Kovacikova, Z., E. Tatrai, und Z. Adamis (1999) Surface changes in type II pneumocytes isolated from rats during the cultivation. *Physiol Res*. 48:309-314.
- Koyama, S., E. Sato, T. Masubuchi, A. Takamizawa, K. Kubo, S. Nagai, und T. Izumi (1998) Alveolar type II-like cells release G-CSF as neutrophil chemotactic activity. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 275:L687-640.
- Koyama, S., E. Sato, A. Tsukadaira, M. Haniuda, H. Numanami, M. Kurai, S. Nagai, und T. Izumi (2002) Vascular endothelial growth factor mRNA and protein expression in airway epithelial cell lines in vitro. *Eur Respir J*. 20:1449-1456.
- Krakauer, T. (2002) Stimulant-Dependent Modulation of Cytokines and Chemokines by Airway Epithelial Cells: Cross Talk between Pulmonary Epithelial and Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Clin. Diagn. Lab. Immunol*. 9:126-131.
- Krane, C.M., C.N. Fortner, A.R. Hand, D.W. McGraw, J.N. Lorenz, S.E. Wert, J.E. Towne, R.J. Paul, J.A. Whitsett, und A.G. Menon (2001) Aquaporin 5-deficient mouse lungs are hyperresponsive to cholinergic stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:14114-14119.
- Kreitz, S., F.O. Fackelmayer, J. Gerdes, und R. Knippers (2000) The proliferation-specific human Ki-67 protein is a constituent of compact chromatin. *Exp Cell Res*. 261:284-292.
- Krensel, K., und R.B. Lichtner (1999) Selective increase of alpha2-integrin sub-unit expression on human carcinoma cells upon EGF-receptor activation. *Int J Cancer*. 80:546-552.
- Krump-Konvalinkova, V., F. Bittinger, R.E. Unger, K. Peters, H.A. Lehr, und C.J. Kirkpatrick (2001) Generation of human pulmonary microvascular endothelial cell lines. *Lab Invest*. 81:1717-1727.
- Krump-Konvalinkova, V., E. Kleideiter, U. Friedrich, U. Klotz, und C.J. Kirkpatrick (2003) Tumorigenic conversion of endothelial cells. *Experimental and Molecular Pathology*. 75:154-159.
- Kulaksiz, H., A. Schmid, M. Honscheid, A. Ramaswamy, und Y. Cetin (2002) Clara cell impact in air-side activation of CFTR in small pulmonary airways. *PNAS*. 99:6796-6801.
- Kurzen, H., S. Manns, G. Dandekar, T. Schmidt, S. Pratzel, und B. Kraling (2002) Tightening of endothelial cell contacts: a physiologic response to cocultures with smooth-muscle-like 10T1/2 cells. *J Invest Dermatol*. 119:143-153.
- Kuzu, I., R. Bicknell, A. Harris, M. Jones, K. Gatter, und D. Mason (1992) Heterogeneity of vascular endothelial cells with relevance to diagnosis of vascular tumours. *J Clin Pathol*. 45:143-148.
- Lacaz-Vieira, F. (1997) Calcium Site Specificity. Early Ca²⁺-related Tight Junction Events. *J Gen Physiol*. 110:727-740.
- Lavie, Y., G. Fiucci, und M. Liscovitch (1998) Up-regulation of caveolae and caveolar constituents in multidrug-resistant cancer cells. *J Biol Chem*. 273:32380-32383.
- Lazrak, A., und S. Matalon (2003) cAMP-induced changes of apical membrane potentials of confluent H441 monolayers. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 285:L443-450.
- Lazzaro, D., M. Price, M. de Felice, und R. Di Lauro (1991) The transcription factor TTF-1 is expressed at the onset of thyroid and lung morphogenesis and in restricted regions of the foetal brain. *Development*. 113:1093-1104.
- Lee, J.-H., L. Del Sorbo, S. Uhlig, G.A. Porro, T. Whitehead, S. Voglis, M. Liu, A.S. Slutsky, und H. Zhang (2004) Intercellular Adhesion Molecule-1 Mediates Cellular Cross-Talk between Parenchymal and Immune Cells after Lipopolysaccharide Neutralization *J Immunol*. 172:608-616.
- Lee, Y.C., C.E. Yellowley, Z. Li, H.J. Donahue, und D.E. Rannels (1997) Expression of functional gap junctions in cultured pulmonary alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 272:L1105-1114.
- Lieber, M., B. Smith, A. Szakal, W. Nelson-Rees, und G. Todaro (1976) A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int J Cancer*. 17:62-70.
- Lindmark, T., Y. Kimura, und P. Artursson (1998) Absorption Enhancement through Intracellular Regulation of Tight Junction Permeability by Medium Chain Fatty Acids in Caco-2 Cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 284:362-369.

- Lo, C.J., M. Fu, und H.G. Cryer (1998) Interleukin 10 inhibits alveolar macrophage production of inflammatory mediators involved in adult respiratory distress syndrome. *J Surg Res.* 79:179-184.
- Lubman, R., und E. Crandall (1992) Regulation of intracellular pH in alveolar epithelial cells. *Am J Physiol.* 262:L1-14.
- Machein, M.R., J. Kullmer, V. Ronicke, U. Machein, M. Krieg, A. Damert, G. Breier, W. Risau, und K.H. Plate (1999) Differential downregulation of vascular endothelial growth factor by dexamethasone in normoxic and hypoxic rat glioma cells. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 25:104-112.
- Madsen, J., A. Kliem, I. Tornøe, K. Skjødt, C. Koch, und U. Holmskov (2000) Localization of Lung Surfactant Protein D on Mucosal Surfaces in Human Tissues. *J Immunol.* 164:5866-5870.
- Mason, R., und M. Williams (1980) Phospholipid composition and ultrastructure of A549 cells and other cultured pulmonary epithelial cells of presumed type II cell origin. *Biochim Biophys Acta.* 617:36-50.
- Mason, R.J., M.C. Lewis, K.E. Edeen, K. McCormick-Shannon, L.D. Nielsen, und J.M. Shannon (2002) Maintenance of surfactant protein A and D secretion by rat alveolar type II cells in vitro. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 282:L249-258.
- Masungi, C., C. Borremans, B. Willems, J. Mensch, A.V. Dijck, P. Augustijns, M.E. Brewster, und M. Noppe (2004) Usefulness of a novel Caco-2 cell perfusion system. I. in vitro prediction of the absorption potential of passively diffused compounds. *J Pharm Sci.* 93:2507-2521.
- Masuzawa, M., T. Fujimura, Y. Hamada, Y. Fujita, H. Hara, S. Nishiyama, K. Katsuoka, H. Tamauchi, und Y. Sakurai (1999) Establishment of a human hemangiosarcoma cell line (ISO-HAS). *Int J Cancer.* 81:305-308.
- Matsui, R., J.S. Brody, und Q. Yu (1999) FGF-2 Induces Surfactant Protein Gene Expression in Foetal Rat Lung Epithelial Cells Through a MAPK-Independent Pathway. *Cellular Signalling.* 11: 221-228.
- Matsukawa, Y., V.H. Lee, E.D. Crandall, und K.J. Kim (1997) Size-dependent dextran transport across rat alveolar epithelial cell monolayers. *J Pharm Sci.* 86:305-309.
- Matsukura, S., F. Kokubu, H. Kubo, T. Tomita, H. Tokunaga, M. Kadokura, T. Yamamoto, Y. Kuroiwa, T. Ohno, H. Suzaki, und M. Adachi (1998) Expression of RANTES by Normal Airway Epithelial Cells after Influenza Virus A Infection. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 18:255-264.
- Matthay, M. (1994) Function of the alveolar epithelial barrier under pathologic conditions. *Chest.* 105:67S-74S.
- Matthay, M.A. (2002) Alveolar Fluid Clearance in Patients With ARDS: Does It Make a Difference? *Chest.* 122:340S-343.
- Matthay, M.A., C. Clerici, und G. Saumon (2002a) Invited review: Active fluid clearance from the distal air spaces of the lung. *J Appl Physiol.* 93:1533-1541.
- Matthay, M.A., H.G. Folkesson, und C. Clerici (2002b) Lung epithelial fluid transport and the resolution of pulmonary edema. *Physiol Rev.* 82:569-600.
- McCormick, C., R. Freshney, und V. Speirs (1995) Activity of interferon alpha, interleukin 6 and insulin in the regulation of differentiation in A549 alveolar carcinoma cells. *Br J Cancer.* 71:Br J Cancer 1995 Feb;1971(1992):1232-1999.
- McCullough, B., S. Schneider, N.D. Greene, und W.G. Johanson, Jr. (1978) Bleomycin-induced lung injury in baboons: alteration of cells and immunoglobulins recoverable by bronchoalveolar lavage. *Lung.* 155:337-358.
- Mehta, D., J. Bhattacharya, M.A. Matthay, und A.B. Malik (2004) Integrated control of lung fluid balance. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 287:L1081-1090.
- Mercer, R., M. Russell, V. Roggli, und J. Crapo (1994) Cell number and distribution in human and rat airways. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 10:613-624.
- Miller, E., A. Cohen, S. Nagao, D. Griffith, R. Maunder, T. Martin, J. Weiner-Kronish, M. Sticherling, E. Christophers, und M. Matthay (1992) Elevated levels of NAP-1/interleukin-8 are present in the airspaces of patients with the adult respiratory distress syndrome and are associated with increased mortality. *Am Rev Respir Dis.* 146:427-432.

- Moore, B.B., M. Peters-Golden, P.J. Christensen, V. Lama, W.A. Kuziel, R. Paine, III, and G.B. Toews (2003) Alveolar epithelial cell inhibition of fibroblast proliferation is regulated by MCP-1/CCR2 and mediated by PGE2. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 284:L342-349.
- Muller, A.M., M.I. Hermanns, C. Cronen, and C.J. Kirkpatrick (2002) Comparative study of adhesion molecule expression in cultured human macro- and microvascular endothelial cells. *Exp Mol Pathol.* 73:171-180.
- Murphy, S., D. Dinsdale, P. Hoet, B. Nemery, and R. Richards (1999) A comparative study of the isolation of type II epithelial cells from rat, hamster, pig and human lung tissue. *Methods Cell Sci.* 21:31-38.
- Nauck, M., M. Roth, M. Tamm, O. Eickelberg, H. Wieland, P. Stulz, and A.P. Perruchoud (1997) Induction of vascular endothelial growth factor by platelet-activating factor and platelet-derived growth factor is downregulated by corticosteroids. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 16:398-406.
- Newman, G.R., L. Campbell, C. von Ruhland, B. Jasani, and M. Gumbleton (1999) Caveolin and its cellular and subcellular immunolocalisation in lung alveolar epithelium: implications for alveolar epithelial type I cell function. *Cell & Tissue Research.* 295:111-120.
- Newman, P., M. Berndt, J. Gorski, G.n. White, S. Lyman, C. Paddock, and W. Muller (1990) PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science.* 247:1219-1222.
- Newman, V., R.F. Gonzalez, M.A. Matthay, and L.G. Dobbs (2000) A Novel Alveolar Type I Cell-Specific Biochemical Marker of Human Acute Lung Injury. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 161:990-995.
- Nikula, K.J., K.J. Avila, W.C. Griffith, and J.L. Mauderly (1997) Lung tissue responses and sites of particle retention differ between rats and cynomolgus monkeys exposed chronically to diesel exhaust and coal dust. *Fundam Appl Toxicol.* 37:37-53.
- Nilsson, M., H. Fagman, and L. Ericson (1996) Ca²⁺-Dependent and Ca²⁺-Independent Regulation of the Thyroid Epithelial Junction Complex by Protein Kinases. *Experimental Cell Research.* 225:1-11.
- Nord, M., M. Lag, T. Cassel, M. Randmark, R. Becher, H. Barnes, P. Schwarze, J. Gustafsson, and J. Lund (1998) Regulation of CCSP (PCB-BP/uteroglobin) expression in primary cultures of lung cells: involvement of C/EBP. *DNA Cell Biol.* 17:481-492.
- Numasaki, M., H. Takahashi, Y. Tomioka, and H. Sasaki (2004) Regulatory roles of IL-17 and IL-17F in G-CSF production by lung microvascular endothelial cells stimulated with IL-1[beta] and/or TNF-[alpha]. *Immunology Letters.* 95:97-104.
- Nusrat, A., J.R. Turner, and J.L. Madara (2000) Molecular Physiology and Pathophysiology of Tight Junctions: IV. Regulation of tight junctions by extracellular stimuli: nutrients, cytokines, and immune cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 279:G851-857.
- O'Reilly, M., J. Clark, and J. Whitsett (1991) Glucocorticoid enhances pulmonary surfactant protein B gene transcription. *Am J Physiol.* 260:L37-43.
- Orfanos, S.E., D. Langleben, J. Khoury, R.D. Schlesinger, L. Dragatakis, C. Roussos, J.W. Ryan, and J.D. Catravas (1999) Pulmonary Capillary Endothelium-Bound Angiotensin-Converting Enzyme Activity in Humans. *Circulation.* 99:1593-1599.
- Oshika, E., S. Liu, L.P. Ung, G. Singh, H. Shinozuka, G. Michalopoulos, and S.L. Katyal (1998) Glucocorticoid-induced effects on pattern formation and epithelial cell differentiation in early embryonic rat lungs. *Pediatr Res.* 43:305-314.
- Paine, R., A. Ben-Ze'ev, S. Farmer, and J. Brody (1988) The pattern of cytokeratin synthesis is a marker of type 2 cell differentiation in adult and maturing fetal lung alveolar cells. *Dev Biol.* 129:505-515.
- Paine, R., P. Christensen, G.B. Toews, and R.H. Simon (1994) Regulation of alveolar epithelial cell ICAM-1 expression by cell shape and cell-cell interactions. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 266:L476-484.
- Paine, R., D. Gaposchkin, C. Kelly, and S. Wilcoxon (1995) Regulation of cytokeratin expression in rat lung alveolar epithelial cells in vitro. *Am J Physiol.* 269:536-544.
- Paine, R., M. Joyce-Brady, A. Clement, and J. Brody (1990) Serum accelerates the loss of type II cell differentiation in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 3:311-323.

- Paine, R., M. Rolfe, T. Standiford, M. Burdick, B. Rollins, and R. Strieter (1993) MCP-1 expression by rat type II alveolar epithelial cells in primary culture. *J Immunol.* 150:4561-4570.
- Pan, T., R.J. Mason, J.Y. Westcott, and J.M. Shannon (2001) Rat Alveolar Type II Cells Inhibit Lung Fibroblast Proliferation In Vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 25:353-682.
- Patterson, C.E., and H. Lum (2001) Update on pulmonary edema: the role and regulation of endothelial barrier function. *Endothelium.* 8:75-105.
- Pechkovsky, D.V., G. Zissel, T. Goldmann, M. Einhaus, C. Taube, H. Magnussen, M. Schlaak, and J. Muller-Quernheim (2002) Pattern of NOS2 and NOS3 mRNA expression in human A549 cells and primary cultured AEC II. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 282:L684-692.
- Pechkovsky, D.V., G. Zissel, M.W. Ziegenhagen, M. Einhaus, C. Taube, K.F. Rabe, H. Magnussen, T. Papadopoulos, M. Schlaak, and J. Muller-Quernheim (2000) Effect of proinflammatory cytokines on interleukin-8 mRNA expression and protein production by isolated human alveolar epithelial cells type II in primary culture. *Eur Cytokine Netw.* 11:618-625.
- Pelletier, M., V. Lavastre, and D. Girard (2002) Activation of Human Epithelial Lung A549 Cells by the Pollutant Sodium Sulfite: Enhancement of Neutrophil Adhesion. *Toxicol. Sci.* 69:210-216.
- Perron Lepage, M.F., V. Gerber, and M.M. Suter (1999) A case of interstitial pneumonia associated with *Pneumocystis carinii* in a foal. *Vet Pathol.* 36:621-624.
- Perry, L.P., M. Iwata, H.D. Tazelaar, T.V. Colby, and S.A. Yousem (1998) Pulmonary mycotoxicosis: a clinicopathologic study of three cases. *Mod Pathol.* 11:432-436.
- Petzeltbauer, P., J.R. Bender, J. Wilson, and J.S. Pober (1993) Heterogeneity of dermal microvascular endothelial cell antigen expression and cytokine responsiveness in situ and in cell culture. *J Immunol.* 151:5062-5072.
- Pryhuber, G.S., R. Khalak, and Q. Zhao (1998) Regulation of surfactant proteins A and B by TNF-alpha and phorbol ester independent of NF-kappa B. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 274:L289-295.
- Ramminger, S.J., K. Richard, S.K. Inglis, S.C. Land, R.E. Olver, and S.M. Wilson (2004) A regulated apical Na⁺ conductance in dexamethasone-treated H441 airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 287:L411-419.
- Rannels, S., R. Grove, and D. Rannels (1989) Matrix-derived soluble components influence type II pneumocytes in primary culture. *Am J Physiol.* 256:C621-629.
- Razani, B., S.E. Woodman, and M.P. Lisanti (2002) Caveolae: From Cell Biology to Animal Physiology. *Pharmacol Rev.* 54:431-467.
- Reynolds, L.J., M. McElroy, and R.J. Richards (1999) Density and substrata are important in lung type II cell transdifferentiation in vitro. *Int J Biochem Cell Biol.* 31:951-960.
- Rice, W.R., J.J. Conkright, C.-L. Na, M. Ikegami, J.M. Shannon, and T.E. Weaver (2002) Maintenance of the mouse type II cell phenotype in vitro. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 283:L256-264.
- Rosenthal, G., D. Germolec, M. Blazka, E. Corsini, P. Simeonova, P. Pollock, L. Kong, J. Kwon, and M. Luster (1994) Asbestos stimulates IL-8 production from human lung epithelial cells. *Immunol.* 153:3237-3244.
- Rosseau, S., J. Selhorst, K. Wiechmann, K. Leissner, U. Maus, K. Mayer, F. Grimminger, W. Seeger, and J. Lohmeyer (2000) Monocyte Migration Through the Alveolar Epithelial Barrier: Adhesion Molecule Mechanisms and Impact of Chemokines. *J Immunol.* 164:427-435.
- Rothen-Rutishauser, B.M., S.G. Kiama, and P. Gehr (2005) A Three-Dimensional Cellular Model of the Human Respiratory Tract to Study the Interaction with Particles. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 32:281-289.
- Rotundo, R.F., T.M. Curtis, M.D. Shah, B. Gao, A. Mastrangelo, S.E. LaFlamme, and T.M. Saba (2002) TNF-alpha disruption of lung endothelial integrity: reduced integrin mediated adhesion to fibronectin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 282:L316-329.
- Roum, J.H., A.S. Aledia, L.A. Carungcong, K.-J. Kim, and Z. Borok (2001) Extracellular glutathione inhibits oxygen-induced permeability changes in alveolar epithelial monolayers. *J Appl Physiol.* 91:748-755.
- Rubenstein, N.M., Y. Guan, P.L. Woo, and G.L. Firestone (2003) Glucocorticoid Down-regulation of RhoA Is Required for the Steroid-induced Organization of the Junctional Complex and Tight Junction Formation in Rat Mammary Epithelial Tumor Cells. *J Biol Chem.* 278:10353-10360.

- Ruegg, C., A.A. Postigo, E.E. Sikorski, E.C. Butcher, R. Pytela, und D.J. Erle (1992) Role of integrin alpha 4 beta 7/alpha 4 beta P in lymphocyte adherence to fibronectin and VCAM-1 and in homotypic cell clustering. *J Cell Biol.* 117:179-189.
- Runswick, S., M. O'Hare, L. Jones, C. Streuli, und D. Garrod (2001) Desmosomal adhesion regulates epithelial morphogenesis and cell positioning. *Nat Cell Biol.* 3:823-830.
- Ryan, U., J. Ryan, und D. Crutchley (1985) The pulmonary endothelial surface. *Fed Proc.* 44:2603-2609.
- Saito, H., H. Shimizu, H. Mita, Y. Maeda, und K. Akiyama (1996) Histamine augments VCAM-1 expression on IL-4- and TNF-alpha-stimulated human umbilical vein endothelial cells. *Int Arch Allergy Immunol.* 111:126-132.
- Sanchez-Esteban, J., L.A. Cicchiello, Y. Wang, S.-W. Tsai, L.K. Williams, J.S. Torday, und L.P. Rubin (2001) Mechanical stretch promotes alveolar epithelial type II cell differentiation. *J Appl Physiol.* 91:589-595.
- Sannes, P., K. Burch, und J. Khosla (1992) Immunohistochemical localization of epidermal growth factor and acidic and basic fibroblast growth factors in postnatal developing and adult rat lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 7:230-237.
- Sannes, P.L., J. Khosla, C.-M. Li, und I. Pagan (1998) Sulfation of extracellular matrices modifies growth factor effects on type II cells on laminin substrata. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 275:L701-708.
- Sartori, C., und M. Matthay (2002) Alveolar epithelial fluid transport in acute lung injury: new insights. *Eur Respir J.* 20:299-313.
- Sasaki, K., T. Murakami, M. Kawasaki, und M. Takahashi (1987) The cell cycle associated change of the Ki-67 reactive nuclear antigen expression. *J Cell Physiol.* 133:579-584.
- Sayegh, R., S.D. Auerbach, X. Li, R.W. Loftus, R.F. Husted, J.B. Stokes, und C.P. Thomas (1999) Glucocorticoid Induction of Epithelial Sodium Channel Expression in Lung and Renal Epithelia Occurs via trans-Activation of a Hormone Response Element in the 5'-Flanking Region of the Human Epithelial Sodium Channel alpha Subunit Gene. *J Biol Chem.* 274:12431-12437.
- Schimmenti, L., H. Yan, J. Madri, und S. Albelda (1992) Platelet endothelial cell adhesion molecule, PECAM-1, modulates cell migration. *J Cell Physiol.* 153:417-428.
- Schmitz, H., M. Fromm, C. Bentzel, P. Scholz, K. Detjen, J. Mankertz, H. Bode, H. Epple, E. Riecken, und J. Schulzke (1999) Tumor necrosis factor-alpha (TNFalpha) regulates the epithelial barrier in the human intestinal cell line HT-29/B6. *J Cell Sci.* 112:137-146.
- Schneeberger, E. (1982) Structure of intercellular junctions in different segments of the intrapulmonary vasculature. *Ann N Y Acad Sci.* 384:54-63.
- Schneeberger, E., D. Walters, und R. Olver (1978) Development of intercellular junctions in the pulmonary epithelium of the foetal lamb. *J Cell Sci.* 32:307-324.
- Schneeberger, E.E., und R.D. Lynch (1992) Structure, function, and regulation of cellular tight junctions. *Am J Physiol.* 262:L647-661.
- Schneeberger, E.E., und R.D. Lynch (2004) The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol.* 286:C1213-1228.
- Schnittler, H. (1998) Structural and functional aspects of intercellular junctions in vascular endothelium. *Basic Res Cardiol.* 93:30-39.
- Scholzen, T., E. Endl, C. Wohlenberg, S. van der Sar, I.G. Cowell, J. Gerdes, und P.B. Singh (2002) The Ki-67 protein interacts with members of the heterochromatin protein 1 (HP1) family: a potential role in the regulation of higher-order chromatin structure. *J Pathol.* 196:135-144.
- Scholzen, T., und J. Gerdes (2000) The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol.* 182:311-322.
- Sedgwick, J.B., I. Menon, J.E. Gern, und W.W. Busse (2002) Effects of inflammatory cytokines on the permeability of human lung microvascular endothelial cell monolayers and differential eosinophil transmigration. *J Allergy Clin Immunol.* 110:752-756.
- Shannon, J., S. Jennings, und L. Nielsen (1992) Modulation of alveolar type II cell differentiated function in vitro. *Am J Physiol.* 262:L427-436.
- Shannon, J., R. Mason, und S. Jennings (1987) Functional differentiation of alveolar type II epithelial cells in vitro: effects of cell shape, cell-matrix interactions and cell-cell interactions. *Biochim Biophys Acta.* 931:143-156.

- Shannon, J.M., T. Pan, L.D. Nielsen, K.E. Edeen, und R.J. Mason (2001) Lung Fibroblasts Improve Differentiation of Rat Type II Cells in Primary Culture. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 24:235-682.
- Shellito, J., C. Esparza, und C. Armstrong (1987) Maintenance of the normal rat alveolar macrophage cell population. The roles of monocyte influx and alveolar macrophage proliferation in situ. *Am Rev Respir Dis.* 135:78-82.
- Shimabukuro, D.W., T. Sawa, und M.A. Gropper (2003) Injury and repair in lung and airways. *Crit Care Med.* 31:S524-531.
- Shimizu, T., M. Nishihara, S. Kawaguchi, und Y. Sakakura (1994) Expression of phenotypic markers during regeneration of rat tracheal epithelium following mechanical injury. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 11:85-94.
- Shimizu, Y., W. Newman, T.V. Gopal, K.J. Horgan, N. Graber, L.D. Beall, G.A. van Seventer, und S. Shaw (1991) Four molecular pathways of T cell adhesion to endothelial cells: roles of LFA-1, VCAM-1, and ELAM-1 and changes in pathway hierarchy under different activation conditions. *J Cell Biol.* 113:1203-1212.
- Simionescu, M. (1980) Ultrastructural organization of the alveolar-capillary unit. *Ciba Found Symp.* 78:11-36.
- Simionescu, M. (1983) Alveolar capillary epithelium, functional morphology. pp 74-82. *In* The cells of the alveolar unit. G. Favez, Junod, A., Leuenberger, P. (Eds). Hans Huber Public, Bern, Stuttgart, Vienna.
- Simon, R.H., J.A. Edwards, M.M. Reza, und R.G. Kunkel (1991) Injury of rat pulmonary alveolar epithelial cells by H₂O₂: dependence on phenotype and catalase. *Am J Physiol.* 260:L318-325.
- Singer, K., B. Stevenson, P. Woo, und G. Firestone (1994) Relationship of serine/threonine phosphorylation/dephosphorylation signaling to glucocorticoid regulation of tight junction permeability and ZO-1 distribution in nontransformed mammary epithelial cells. *J Biol Chem.* 269:16108-16115.
- Smith, S.K., und G. Giannopoulos (1985) Influence of pulmonary endothelial cells on fetal lung development. *Pediatr Pulmonol.* 1:S53-59.
- Speirs, V., K. Ray, und R. Freshney (1991) Paracrine control of differentiation in the alveolar carcinoma, A549, by human foetal lung fibroblasts. *Br J Cancer.* 64:693-699.
- Stahlman, M., M. Gray, und J. Whitsett (1996) Expression of thyroid transcription factor-1(TTF-1) in fetal and neonatal human lung. *Histochem Cytochem.* 44:673-678.
- Standiford, T., S. Kunkel, M. Basha, S. Chensue, J.r. Lynch, G. Toews, J. Westwick, und R. Strieter (1990) Interleukin-8 gene expression by a pulmonary epithelial cell line. A model for cytokine networks in the lung. *J Clin Invest.* 86:1945-1953.
- Standiford, T., S. Kunkel, S. Phan, B. Rollins, und R. Strieter (1991) Alveolar macrophage-derived cytokines induce monocyte chemoattractant protein-1 expression from human pulmonary type II-like epithelial cells. *J Biol Chem.* 266:9912-9918.
- Stellato, C., L. Beck, G. Gorgone, D. Proud, T. Schall, S. Ono, L. Lichtenstein, und R. Schleimer (1995) Expression of the chemokine RANTES by a human bronchial epithelial cell line. Modulation by cytokines and glucocorticoids. *J Immunol.* 155:410-418.
- Stockinger, H., S. Gadd, R. Eher, O. Majdic, W. Schreiber, W. Kasinrerker, B. Strass, E. Schnabl, und W. Knapp (1990) Molecular characterization and functional analysis of the leukocyte surface protein CD31. *J Immunol.* 145:3889-3897.
- Strunk, R., D. Eidlen, und R. Mason (1988) Pulmonary alveolar type II epithelial cells synthesize and secrete proteins of the classical and alternative complement pathways. *J Clin Invest.* 81:1419-1426.
- Stuart, R., und S. Nigam (1995) Regulated Assembly of Tight Junctions by Protein Kinase C. *PNAS.* 92:6072-6076.
- Sugahara, K., R.J. Mason, und J.M. Shannon (1998) Effects of soluble factors and extracellular matrix on DNA synthesis and surfactant gene expression in primary cultures of rat alveolar type II cells. *Cell & Tissue Research.* 291:295-303.
- Takagi, M., Y. Matsuoka, T. Kurihara, und Y. Yoneda (1999) Chmadrin: a novel Ki-67 antigen-related perichromosomal protein possibly implicated in higher order chromatin structure. *J Cell Sci.* 112:2463-2472.

- Takezawa, C., H. Takahashi, T. Fujishima, M. Shiratori, Y. Morita, H. Sano, Y. Kuroki, and S. Abe (2002) Assessment of differentiation in adenocarcinoma cells from pleural effusion by peripheral airway cell markers and their diagnostic values. *Lung Cancer*. 38:273-281.
- Tanaka, Y., S. Albelda, K. Horgan, G. van Seventer, Y. Shimizu, W. Newman, J. Hallam, P. Newman, C. Buck, and S. Shaw (1992) CD31 expressed on distinctive T cell subsets is a preferential amplifier of beta 1 Integrin-mediated adhesion. *J Exp Med*. 176:245-253.
- Tang, V.W., and D.A. Goodenough (2003) Paracellular Ion Channel at the Tight Junction. *Biophys J*. 84:1660-1673.
- Tateda, K., J.C. Deng, T.A. Moore, M.W. Newstead, R. Paine, 3rd, N. Kobayashi, K. Yamaguchi, and T.J. Standiford (2003) Hyperoxia mediates acute lung injury and increased lethality in murine Legionella pneumonia: the role of apoptosis. *J Immunol*. 170:4209-4216.
- Tavelin, S., V. Milovic, G. Ocklind, S. Olsson, and P. Artursson (1999) A Conditionally Immortalized Epithelial Cell Line for Studies of Intestinal Drug Transport. *J Pharmacol Exp Ther*. 290:1212-1221.
- Thickett, D.R., L. Armstrong, and A.B. Millar (2002) A Role for Vascular Endothelial Growth Factor in Acute and Resolving Lung Injury. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 166:1332-1337.
- Thomassen, M.J., L.T. Divis, and C.J. Fisher (1996) Regulation of Human Alveolar Macrophage Inflammatory Cytokine Production by Interleukin-10. *Clinical Immunology and Immunopathology*. 80:321-324.
- Tom, B., A. Dendorfer, R. de Vries, P.R. Saxena, and A.H. Jan Danser (2002) Bradykinin potentiation by ACE inhibitors: a matter of metabolism. *Br J Pharmacol*. 137:276-284.
- Travis, E.L., R.A. Harley, J.O. Fenn, C.J. Klobukowski, and H.B. Hargrove (1977) Pathologic changes in the lung following single and multi-fraction irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2:475-490.
- Turner, J.R. (2000) 'Putting the squeeze' on the tight junction: understanding cytoskeletal regulation. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 11:301-308.
- Turner, J.R., J.M. Angle, E.D. Black, J.L. Joyal, D.B. Sacks, and J.L. Madara (1999) PKC-dependent regulation of transepithelial resistance: roles of MLC and MLC kinase. *Am J Physiol Cell Physiol*. 277:C554-562.
- Turner, J.R., B.K. Rill, S.L. Carlson, D. Carnes, R. Kerner, R.J. Mrsny, and J.L. Madara (1997) Physiological regulation of epithelial tight junctions is associated with myosin light-chain phosphorylation. *Am J Physiol Cell Physiol*. 273:C1378-1385.
- Underwood, J.L., C.G. Murphy, J. Chen, L. Franse-Carman, I. Wood, D.L. Epstein, and J.A. Alvarado (1999) Glucocorticoids regulate transendothelial fluid flow resistance and formation of intercellular junctions. *Am J Physiol Cell Physiol*. 277:C330-342.
- Unger, R.E., V. Krump-Konvalinkova, K. Peters, and C.J. Kirkpatrick (2002) In Vitro Expression of the Endothelial Phenotype: Comparative Study of Primary Isolated Cells and Cell Lines, Including the Novel Cell Line HPMEC-ST1.6R. *Microvascular Research*. 64:384-397.
- van der Poll, T., and S.F. Lowry (1995) Tumor necrosis factor in sepsis: mediator of multiple organ failure or essential part of host defense? *Shock*. 3:1-12.
- Vanderbilt, J.N., and L.G. Dobbs (1998) Characterization of the Gene and Promoter for RTI40, a Differentiation Marker of Type I Alveolar Epithelial Cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 19:662-635.
- Venkatesh, V., D. Iannuzzi, R. Ertsey, and P. Ballard (1993) Differential glucocorticoid regulation of the pulmonary hydrophobic surfactant proteins SP-B and SP-C. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 8:222-228.
- Verheijen, R., H.J. Kuijpers, R. van Driel, J.L. Beck, J.H. van Dierendonck, G.J. Brakenhoff, and F.C. Ramaekers (1989) Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen. II. Localization in mitotic cells and association with chromosomes. *J Cell Sci*. 92:531-540.
- Vestweber, D. (2000) Molecular mechanisms that control endothelial cell contacts. *J Pathol*. 190:281-291.
- Voorhout, W.F., T. Veenendaal, Y. Kuroki, Y. Ogasawara, L.M. van Golde, and H.J. Geuze (1992) Immunocytochemical localization of surfactant protein D (SP-D) in type II cells, Clara cells, and alveolar macrophages of rat lung. *J Histochem Cytochem*. 40:1589-1597.
- Warburton, D., and S. Bellusci (2004) The molecular genetics of lung morphogenesis and injury repair. *Paediatr Respir Rev*. 5 Suppl A:S283-287.

- Warburton, D., C. Wuenschell, G. Flores-Delgado, and K. Anderson (1998) Commitment and differentiation of lung cell lineages. *Biochem Cell Biol.* 76:971-995.
- Ward, H., und T. Nicholas (1984) Alveolar type I and type II cells. *Aust N Z J Med.* 14:731-734.
- Ward, P., T. Tippin, und D. Thakker (2000) Enhancing paracellular permeability by modulating epithelial tight junctions. *Pharm Sci Technol Today.* 3:346-358.
- Waters, C.M., J.M. Taylor, A. Molteni, und W.F. Ward (1996) Dose-response effects of radiation on the permeability of endothelial cells in culture. *Radiat Res.* 146:321-328.
- Weber, B., M. Rosel, R. Arch, P. Moller, und M. Zoller (1996) Transient expression of CD44 variant isoforms in the ontogeny of the rat: ectoderm-, endoderm- and mesoderm-derived cells express different exon combinations. *Differentiation.* 60:17-29.
- Weibel, E. (1974) A note on differentiation and divisibility of alveolar epithelial cells. *Chest.* 65:Suppl:19S-21S.
- Weibel, E.R., P. Untersee, J. Gil, und M. Zulauf (1973) Morphometric estimation of pulmonary diffusion capacity. VI. Effect of varying positive pressure inflation of air spaces. *Respir Physiol.* 18:285-308.
- Welsh, D.A., B.P.H. Guery, B.P. Deboisblanc, E.P. Dobard, C. Creusy, D. Mercante, S. Nelson, W.R. Summer, und C.M. Mason (2001) Keratinocyte growth factor attenuates hydrostatic pulmonary edema in an isolated, perfused rat lung model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 280:H1311-1317.
- White, C.W., K.E. Greene, C.B. Allen, und J.M. Shannon (2001) Elevated Expression of Surfactant Proteins in Newborn Rats during Adaptation to Hyperoxia. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 25:51-59.
- Whitsett, J., A. Budden, W. Hull, J. Clark, und M. O'Reilly (1992) Transforming growth factor-beta inhibits surfactant protein A expression in vitro. *Biochim Biophys Acta.* 1123:257-262.
- Williams, M.C., Y. Cao, A. Hinds, A.K. Rishi, und A. Wetterwald (1996) T1 alpha protein is developmentally regulated and expressed by alveolar type I cells, choroid plexus, and ciliary epithelia of adult rats. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 14:577-585.
- Wimmel, A., E. Kogan, A. Ramaswamy, und M. Schuermann (2001) Variant expression of CD44 in preneoplastic lesions of the lung. *Cancer.* 92:1231-1236.
- Winton, H., H. Wan, M. Cannell, D. Gruenert, P. Thompson, D. Garrod, G. Stewart, und R. C. (1998) Cell lines of pulmonary and non-pulmonary origin as tools to study the effects of house dust mite proteinases on the regulation of epithelial permeability. *Clin Exp Allergy.* 28:1273-1285.
- Wise, J., und J.F. Lechner (2002) Normal Human Bronchial Epithelial Cell Culture. pp 257-276. *In* Culture of epithelial cells. R.I. Freshney und M.G. Freshney (Eds). Wiley-Liss, New York.
- Witherden, I.R., E.J. Vanden Bon, P. Goldstraw, C. Ratcliffe, U. Pastorino, und T.D. Tetley (2004) Primary human alveolar type II epithelial cell chemokine release: effects of cigarette smoke and neutrophil elastase. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 30:500-509.
- Wojciak-Stothard, B., A. Entwistle, R. Garg, und A.J. Ridley (1998) Regulation of TNF-alpha-induced reorganization of the actin cytoskeleton and cell-cell junctions by Rho, Rac, and Cdc42 in human endothelial cells. *J Cell Physiol.* 176:150-165.
- Wong, V., D. Ching, P.D. McCrea, und G.L. Firestone (1999) Glucocorticoid Down-regulation of Fascin Protein Expression Is Required for the Steroid-induced Formation of Tight Junctions and Cell-Cell Interactions in Rat Mammary Epithelial Tumor Cells. *J Biol Chem.* 274:5443-5453.
- Woo, P.L., A. Cercek, P.-Y. Desprez, und G.L. Firestone (2000) Involvement of the Helix-Loop-Helix Protein Id-1 in the Glucocorticoid Regulation of Tight Junctions in Mammary Epithelial Cells. *J Biol Chem.* 275:28649-28658.
- Woo, P.L., D. Ching, Y. Guan, und G.L. Firestone (1999) Requirement for Ras and Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling Uncouples the Glucocorticoid-induced Junctional Organization and Transepithelial Electrical Resistance in Mammary Tumor Cells. *J Biol Chem.* 274:32818-32828.
- Woodcock-Mitchell, J., J. Mitchell, S. Reynolds, K. Leslie, und R. Low (1990) Alveolar epithelial cell keratin expression during lung development. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2:503-514.
- Wottrich, R. (2004). Zur toxikologischen Untersuchung ultrafeiner Partikel: Entwicklung und Einsatz einer realitätsnahen *in vitro* Lungenmodells. Dissertation. Fakultät für Chemie- und Biowissenschaften der Technischen Universität Karlsruhe. pp 1-125.

- Wottrich, R., S. Diabate, und H.F. Krug (2004) Biological effects of ultrafine model particles in human macrophages and epithelial cells in mono- and co-culture. *Int J Hyg Environ Health*. 207:353-361.
- Xu, X., K. McCormick-Shannon, D.R. Voelker, und R.J. Mason (1998) KGF Increases SP-A and SP-D mRNA Levels and Secretion in Cultured Rat Alveolar Type II Cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 18:168-682.
- Yee, S. (1997) In vitro permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict in vivo (small intestinal) absorption in man-fact or myth. *Pharm Res*. 14:763-766.
- Yevdokimova, N., und R. Freshney (1997) Activation of paracrine growth factors by heparan sulphate induced by glucocorticoid in A549 lung carcinoma cells. *Br J Cancer*. 76:281-289.
- Yoo, J.W., Y.S. Kim, S.H. Lee, M.K. Lee, H.J. Roh, B.H. Jhun, C.H. Lee, und D.D. Kim (2003) Serially passaged human nasal epithelial cell monolayer for in vitro drug transport studies. *Pharm Res*. 20:1690-1696.
- Zachlederova, M., und P. Jarolim (2003) Gene expression profiles of microvascular endothelial cells after stimuli implicated in the pathogenesis of vasoocclusion. *Blood Cells Mol Dis*. 30:70-81.
- Zettl, K., M. Sjaastad, P. Riskin, G. Parry, T. Machen, und G. Firestone (1992) Glucocorticoid-Induced Formation of Tight Junctions in Mouse Mammary Epithelial Cells in vitro. *PNAS*. 89:9069-9073.
- Zhang, L., J.A. Whitsett, und B.R. Stripp (1997) Regulation of Clara cell secretory protein gene transcription by thyroid transcription factor-1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Gene Structure and Expression*. 1350: 359-367.
- Zhou, L., L. Lim, R. Costa, und J. Whitsett (1996) Thyroid transcription factor-1, hepatocyte nuclear factor-3beta, surfactant protein B, C, and Clara cell secretory protein in developing mouse lung. *J Histochem Cytochem*. 44:1183-1193.
- Zimmerman, G.A., S.M. Prescott, und T.M. McIntyre (1992) Endothelial cell interactions with granulocytes: tethering and signaling molecules. *Immunol Today*. 13:93-100.

ANHANG

A. Bestimmung der Zellzahl im Verlauf der Kultur mit verschiedenen Medien

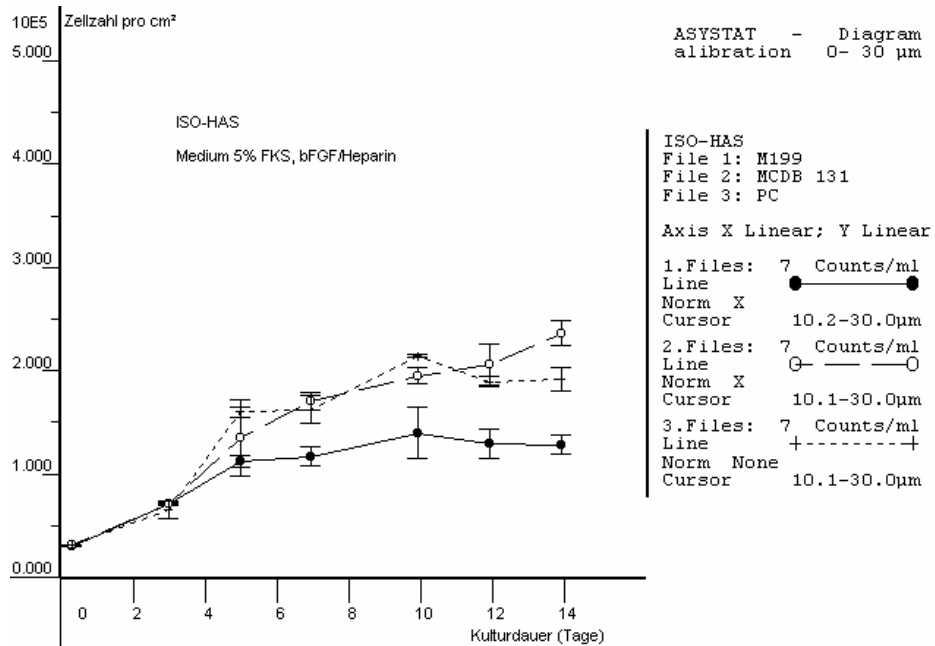


Abb. I Proliferationskurve von *ISO-HAS-1* in verschiedenen Medien. Entwicklung der Zellzahl im Verlauf der Kultur von *ISO-HAS-1* in M199 (●—●), MCDB 131 (○—○), und PC-Medium (+ - - - +) mit 5% FKS und bFGF/Heparin (2,5 ng/10 µg/ml), Vorkultur in PC bzw. M199-Medium mit 15% FKS und bFGF/Heparin (2,5 ng/10 µg/ml). Die Wachstumskurve von *ISO-HAS-1* erreichte nach 10 Tagen in allen Medien ein Plateau, wobei die Zellzahlen in MCDB 131 und PC-Medium ähnlich hoch waren.

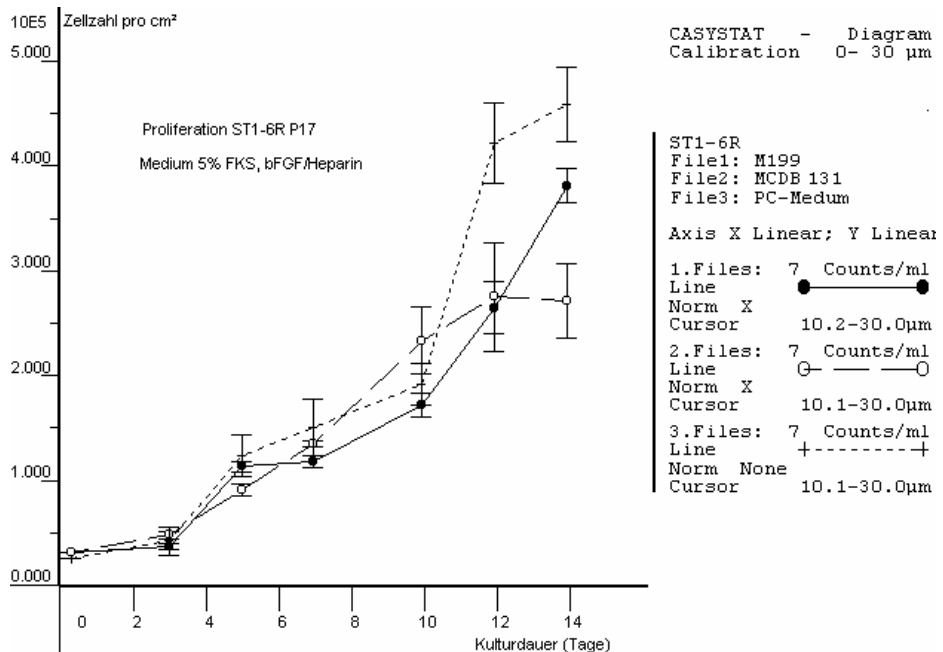


Abb. II Proliferationskurve von *ST1-6.R* in verschiedenen Medien. Entwicklung der Zellzahl im Verlauf der Kultur von *ST1-6.R* in M199 (●—●), MCDB 131 (○—○), und PC-Medium (+ - - - +) mit 5% FKS und bFGF/Heparin (2,5 ng/10 µg/ml), Vorkultur in PC bzw. M199-Medium mit 15% FKS und bFGF/Heparin (2,5 ng/10 µg/ml). Die Zellzahl von *ST1-6.R* stieg unabhängig vom Medium stetig an.

ANHANG

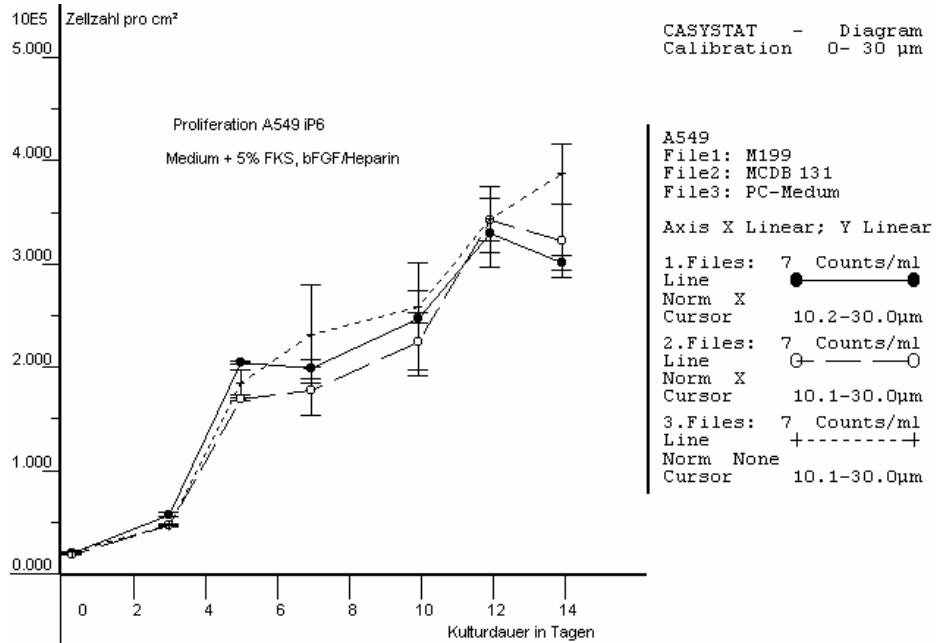


Abb. III Proliferationskurve von A549 in verschiedenen Medien. Entwicklung der Zellzahl im Verlauf der Kultur von A549 in M199 (●——●), MCDB 131 (○——○), und PC-Medium (+-----+) mit 5% FKS und bFGF/Heparin (2,5 ng/10 µg/ml), Vorkultur in PC bzw. M199-Medium mit 15% FKS und bFGF/Heparin (2,5 ng/10 µg/ml). Die Zellzahl von A549 stieg unabhängig vom Medium stetig an.

B. Zellzahl und Differenzierung im Verlauf der Kultur mit verschiedenen Serumkonzentrationen

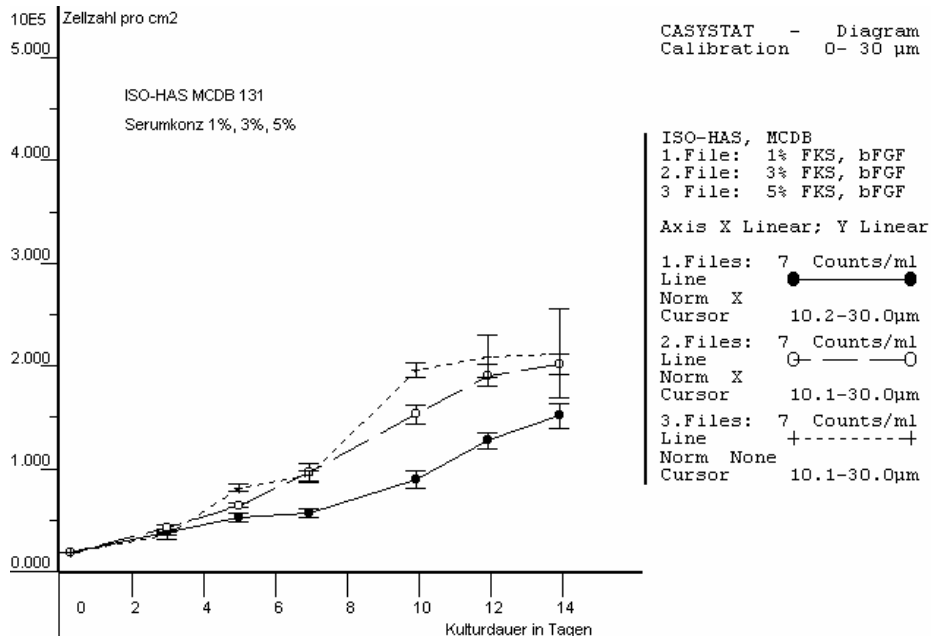


Abb. IV Proliferationskurve von ISO-HAS-1 mit verschiedenen Serumkonzentrationen. Entwicklung der Zellzahl im Verlauf einer Kultur von ISO-HAS-1 in MCDB 131 mit bFGF/ Heparin (5 ng/10µg/ml) und 1% (●——●), 3% (○——○) bzw. 5% (+-----+) FKS, Vorkultur in MCDB 131 mit bFGF/Heparin (5 ng/10µg/ml) und 15% FKS). Die Wachstumskurve von ISO-HAS-1 erreichte nach 10 Tagen in Ko-Kulturmedium mit 5% FKS ein Plateau. Bei einer Serumkonzentration von 3% FKS wurde das Plateau erst am Tag 14 erreicht. Mit 1% FKS in Ko-Kulturmedium wurde die maximale Zellzahl bis zum Tag 14 nicht erreicht.

ANHANG

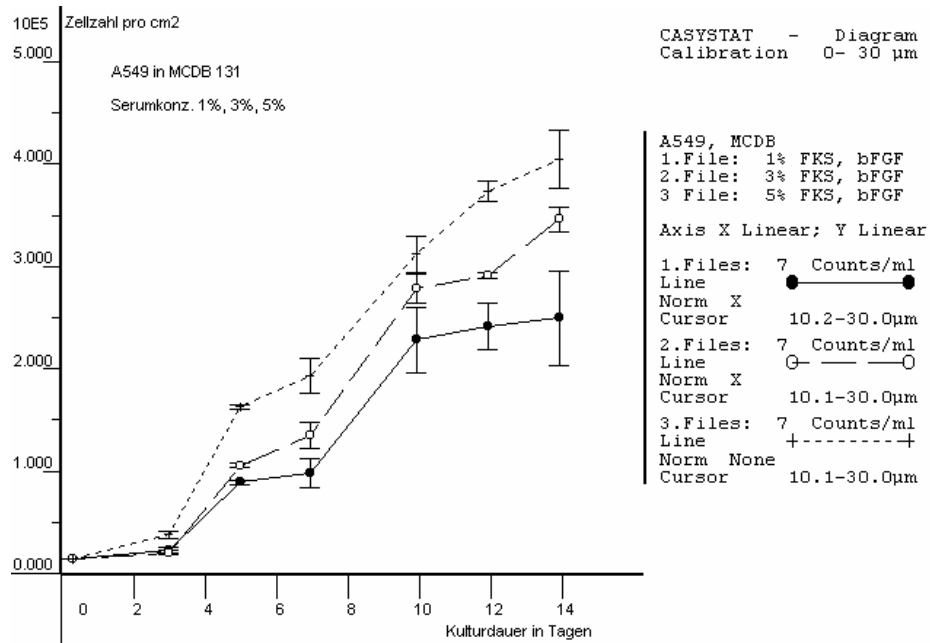


Abb. V Proliferationskurve von A549 mit verschiedenen Serumkonzentrationen. Entwicklung der Zellzahl im Verlauf einer Kultur von A549 in MCDB 131 mit bFGF/Heparin (5 ng/10µg/ml) und 1% (●—●), 3% (○—○) bzw. 5% (+ - - - +) FKS, Vorkultur in MCDB 131 mit bFGF/Heparin (2,5 ng/10µg/ml) und 5% FKS. Bei einer Serumkonzentration von 5% und 3% FKS stieg die Zellzahl von A549 in Ko-Kulturmedium stetig an. Die Wachstumskurve von A549 erreichte nach 10 Tagen in Ko-Kulturmedium mit 1% FKS ein Plateau.

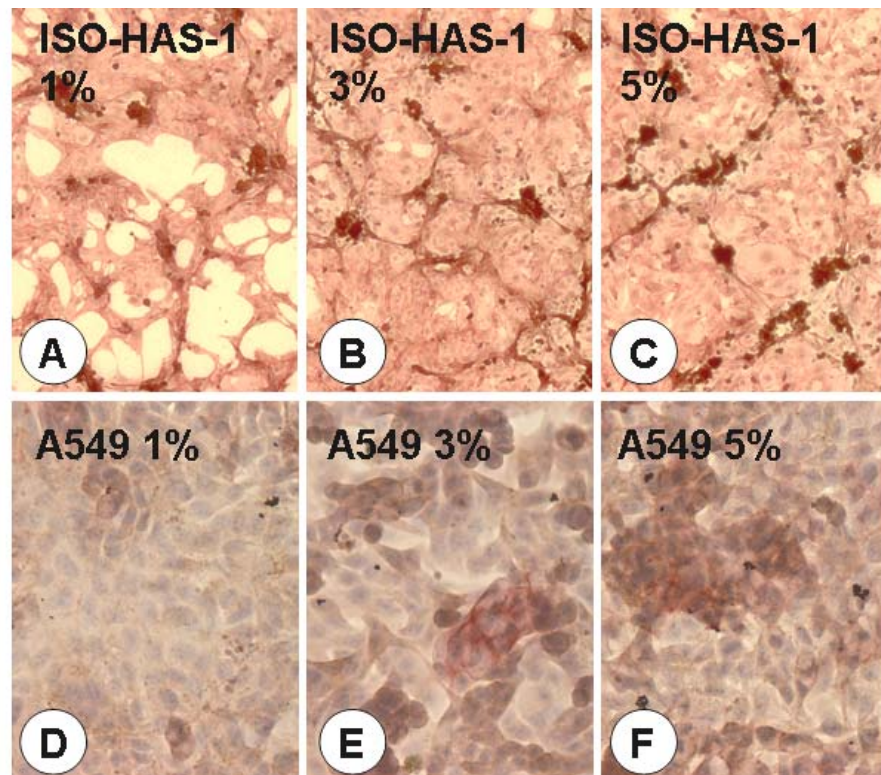


Abb. VI Immunzytochemische Markierung des Zell-Zell-Kontaktmoleküls PECAM-1 bei ISO-HAS-1 und E-Cadherin bei A549 in Ko-Kulturmedium mit 1%, 3% und 5% FKS. ISO-HAS-1 (A-C) bzw. A549 (D-F) in MCDB 131 mit 1, 3 bzw. 5% FKS. Markierung von Caveolin-1 (DAB, braun) und E-Cadherin (AP, rot) mittels Immunzytochemie am Tag 14 (100x)

ANHANG

C. Bestimmung der Zellzahl im Verlauf der Kultur mit serumfreiem Medium

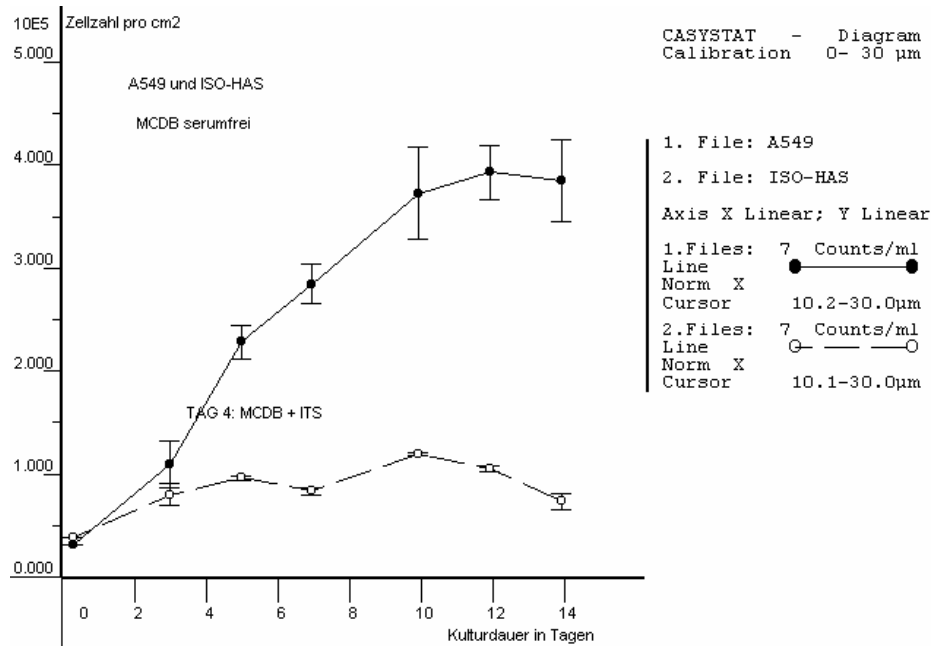


Abb. VII Proliferationskurve von ISO-HAS-1 und A549 in serumfreiem Medium. Entwicklung der Zellzahl im Verlauf einer Kultur von ISO-HAS-1 (○—○) und A549 (●—●) in MCDB 131 mit ITS⁺, Vorkultur in MCDB 131 mit bFGF/Heparin (5 ng/10µg/ml) und 5% FKS bis zum Tag 3. In serumfreiem Medium erreichte die Wachstumskurve von ISO-HAS-1 nach 4 Tagen ein Plateau. Die Wachstumskurve von A549 Zellen erreichte nach 10 Tagen in serumfreiem Medium ein Plateau, wobei die Zellzahl 4fach höher als die der ISO-HAS-1 Zellen war.

ANHANG

D. Expression von Differenzierungsmarkern im Verlauf der Kultur mit serumfreiem Medium

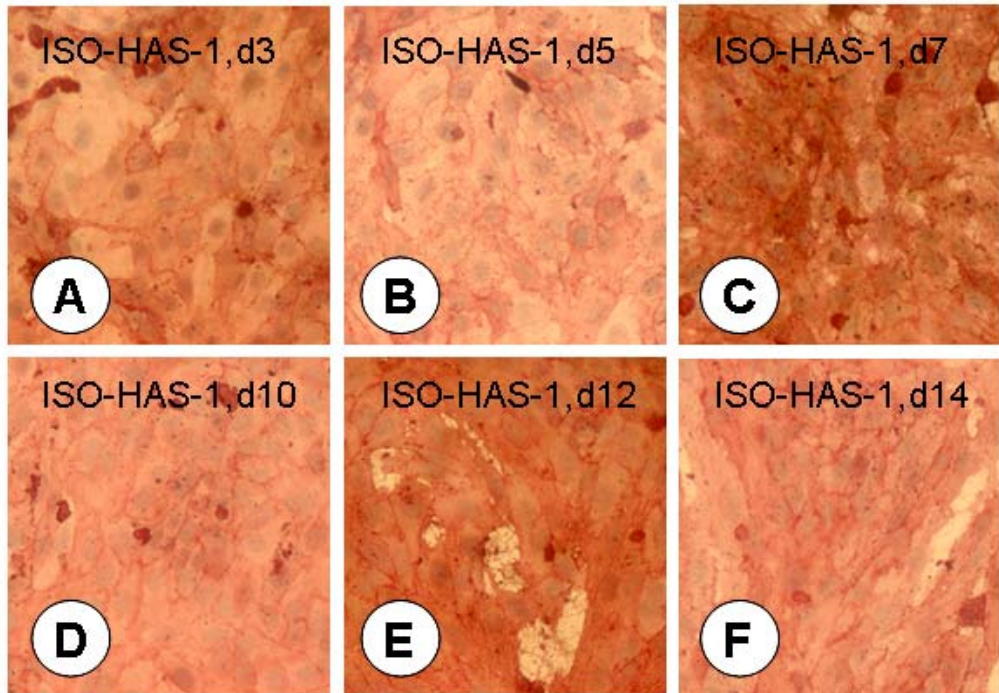


Abb. VIII Immunzytochemische Markierung des Zell-Zell-Kontaktmoleküles PECAM-1 und von Fibronektin (FN) bei ISO-HAS-1 im Verlauf der Kultur in serumfreiem Ko-Kulturmedium. ISO-HAS-1 in MCDB 131 mit 5% FKS bis Tag 3, ab Tag 3 ITS⁺. Markierung von PECAM-1 (AP, rot) mittels Immunzytochemie am Tag 5, 10, 14 (100x), Markierung von FN (DAB, braun) und PECAM-1 (AP, rot) mittels Immunzytochemie am Tag 3, 7, 12 (100x).

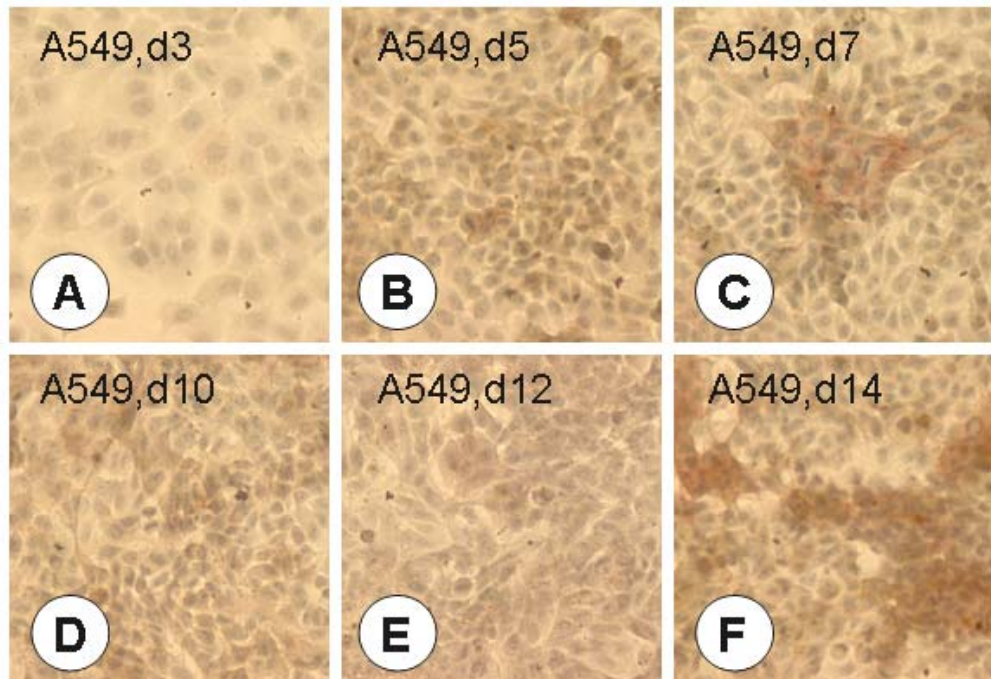


Abb. IX Immunzytochemische Markierung des Zell-Zell-Kontaktmoleküles E-Cadherin und von Caveolin-1 bei A549 im Verlauf der Kultur in serumfreiem Ko-Kulturmedium. A549 in MCDB 131 mit 5% FKS bis Tag 3, ab Tag 3 ITS⁺. Markierung von Caveolin-1 (DAB, braun) und E-Cadherin (AP, rot) am Tag 3, 5, 7, 10, 12, 14 (200x)