

**Aus dem Institut für Anatomie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. Jürgen Westermann**

**Beeinflussung der Regeneration des murinen
Trachealepithels durch mikrobielle Bestandteile**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

Aus der Sektion Naturwissenschaften

vorgelegt von

Kristin Döring

aus Hohenmölsen

Lübeck 2014

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Peter König

2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Heinz Fehrenbach

Tag der mündlichen Prüfung: 04.12.2015

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 07.12.2015

Es erscheint immer unmöglich, bis es vollbracht ist.

(Nelson Mandela)

I Inhaltsverzeichnis

I	Inhaltsverzeichnis	I
II	Abkürzungsverzeichnis	IV
1	Einleitung	1
1.1	Aufbau der Atemwege	2
1.2	Wirkung von LPS auf das Atemwegsepithel	6
1.3	Modelle zur Schädigung und Regeneration des Epithels der Maus	7
1.4	Ziel der Arbeit	12
2	Material	13
2.1	Mausstamm	13
2.2	Chemikalien, Reagenzien, Kits und Verbrauchsmaterialien	13
2.3	Puffer und Lösungen	15
2.4	Primer und fluoreszenzmarkierte Sonden	18
2.5	Antikörper	19
2.5.1	primäre Antikörper	19
2.5.2	sekundäre Antikörper	19
2.6	Präparierbesteck	19
2.7	Geräte	20
3	Methoden	21
3.1	Inkubation der Trachea mit Naphthalin und Vehikel <i>ex vivo</i>	21
3.2	Tierversuchsgenehmigung	21
3.3	Versuchsaufbau der <i>in vivo</i> Naphthalin-Experimente	22
3.4	Präparation von Trachea und Lunge	23
3.5	Rasterelektronenmikroskopie und Semidünnschnitte	23
3.5.1	Einbettung für Semidünnschnitte	23
3.5.2	Erstellen von Semidünnschnitten sowie Färbung	23
3.5.3	Präparation für REM	24
3.5.4	Auszählung der Zellanzahl über dem Band- und Knorpelbereich der Trachea	24
3.5.5	Bestimmung der Fläche zilientragender und nicht-zilientragender Zellen	24

3.6	Immunhistochemische Färbung.....	25
3.6.1	Anfertigung von Kryostatschnitten aus Gewebe.....	25
3.6.2	Direktmarkierung von Antikörpern.....	25
3.6.3	Immunhistochemische Färbung der Kryostatschnitte.....	25
3.6.4	Auszählung der proliferierenden Zellen.....	26
3.7	Quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion.....	26
3.7.1	RNA-Isolation.....	26
3.7.2	cDNA-Synthese.....	27
3.7.3	Quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion.....	28
3.8	Untersuchung der Zilienschlagfrequenz und des Partikeltransportes mittels Hochgeschwindigkeitsmikroskopie.....	29
3.8.1	Ermittlung der Zilienschlagfrequenz.....	29
3.8.2	Ermittlung der Transportgeschwindigkeit.....	30
3.9	Versuchsaufbau zur Untersuchung der Regeneration des Trachealepithels nach Intervention mit Lipopolysaccharid (LPS).....	31
3.10	Statistische Analyse.....	32
4	Ergebnisse.....	33
4.1	<i>Ex vivo</i> Schädigung des Trachealepithels der Maus mittels Naphthalin.....	33
4.2	<i>In vivo</i> Schädigung des Atemwegsepithels mittels Naphthalin.....	34
4.2.1	Auswirkung von Naphthalin im murinen Tiermodell.....	34
4.2.2	<i>In vivo</i> Regeneration des Atemwegsepithels der Maus nach Naphthalin-Gabe.....	35
4.2.3	Untersuchung der mRNA-Expression von CC10, CYP2F2 und FoxJ1 im Trachealepithel im Zeitraum von 48 h bis 15 d.....	50
4.2.4	Morphologische Veränderung der Basalzellen im Trachealepithel der Maus während der Regeneration.....	55
4.2.5	Proliferationsanstieg im Trachealepithel von 24 h (1 d) bis 5 d nach Naphthalin-Gabe.....	56
4.3	Zilienschlag und Partikeltransport während und nach der Regeneration des Trachealepithels.....	58

4.4	Beeinflussung der Regeneration des Trachealepithels der Maus durch einmalige Gabe von Lipopolysacchariden (LPS)	61
4.4.1	mRNA-Expression von CC10, CYP2F2 und FoxJ1 4 d nach Naphthalin-Gabe und LPS-Gabe	66
4.4.2	Basalzellen und Proliferation im Trachealepithel der Maus nach LPS-Intervention	69
4.5	Beeinflussung von Zilienschlag und Partikeltransport im Trachealepithel der Maus durch LPS-Intervention	72
4.6	Gestörte epitheliale Ausrichtung im regenerierten Trachealepithel der Maus	76
4.7	Zellverteilung im Trachealepithel der Maus nach der Regeneration.....	79
5	Diskussion	82
5.1	Eignung des Naphthalinmodells zur Untersuchung der Regeneration des Trachealepithels der Maus	83
5.2	Regenerationsablauf des Epithels nach Naphthalin-Gabe in intrapulmonalen Atemwegen verglichen mit der Trachea	86
5.2.1	Gemeinsamkeiten bei der Regeneration des Epithels der Trachea und der intrapulmonalen Atemwege.....	86
5.2.2	Unterschiede bei der Regeneration des Epithels der Trachea und der intrapulmonalen Atemwege.....	88
5.2.3	Zilienvermittelter Partikeltransport des Trachealepithels nach Naphthalin-Gabe	91
5.2.4	Zeitpunktdefinition für die Intervention mit LPS	91
5.3	Einfluss von LPS auf das Epithel der Trachea der Maus.....	92
5.3.1	Auswirkung von LPS auf die Proliferation und Differenzierung des Trachealepithels.....	92
5.3.2	Auswirkung von LPS auf den Transport nach der Regeneration.....	96
5.4	LPS kann langfristige Schäden verursachen	101
6	Zusammenfassung	102
7	Literaturverzeichnis	104
8	Danksagung.....	115

II Abkürzungsverzeichnis

A. dest.	destilliertes Wasser
Abb.	Abbildung
ATP	Adenosin-5'Triphosphat
cDNA	komplementäre DNA
C _T	Zykluswert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	2'-Desoxy-Nukleosid-5'Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
g	Gramm
h	Stunden
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
hk	housekeeping
Hz	Hertz
IHC	Immunhistochemie
kDA	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharid
M	molar (mol/Liter)
mg/ml	Milligramm/Milliliter
µm/s	Mikrometer/Sekunde
min	Minuten
mM	Millimolar
ml	Milliliter
mRNA	messenger RNA
MW	Mittelwert
µg/g	Mikrogramm/Gramm
µl	Mikroliter
N	Stoffmenge 1 Mol entspricht 6,022 x 10 ²³ Teilchen
ng	Nanogramm
ng/µl	Nanogramm/Mikroliter

NaOH	Natriumhydroxid
NA	Naphthalin
PBS	Phosphat-gepuffertes NaCl
pH	neg. Logarithmus der $H^+(aq)$ -Ionenkonzentration (mol/l)
PFA	Paraformaldehyd
qRT-PCR	quantitative Real Time Polymerasekettenreaktion
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
ü.N.	über Nacht
Vol.	Volumen

1 Einleitung

Tagtäglich sind wir äußeren Umwelteinflüssen wie Pathogenen, Zigarettenrauch, Motorenabgasen, Allergenen oder auch Substanzen aus Verbrennungsanlagen ausgesetzt. All diese körperfremden Substanzen nehmen wir mit jedem Atemzug über die Nase oder den Mund in unsere Atemwege auf. Auch wenn die Nase bereits einige Substanzen herausfiltert, gelangen doch noch sehr viele kleinere Partikel in die unteren Atemwege. Sind Staub, Rauch, Partikel oder auch Bakterien sowie Viren erst einmal in die Atemwege gelangt, treten diese mit dem Epithel in Kontakt. Von großer Bedeutung ist deshalb ein gesundes, nicht-geschädigtes Atemwegsepithel. Hier werden die aufgenommenen Substanzen mit Hilfe des gerichteten Zilienschlags zilientrager Zellen (durch sogenannte zilienvermittelte Reinigung (Wanner et al., 1996)) wieder abtransportiert oder abgehustet und dann verschluckt.

Ist das Atemwegsepithel jedoch geschädigt, regeneriert es sich innerhalb von drei Wochen von selbst (Tam et al., 2011). Je nachdem wie stark das Epithel geschädigt ist, kann es sein, dass im Zeitraum der Regeneration der Abtransport fremder Bestandteile aufgrund geschädigter zilientrager Zellen nicht gewährleistet werden kann (Aherne et al., 1970). Dadurch haben es Mikroorganismen (wie Bakterien oder Viren) leichter, durch die defekte Epithelbarriere zu gelangen und Infektionen zu verursachen (Vareille et al., 2011). Durch Infektionen können so beispielsweise chronische Atemwegsentzündungen wie nicht-allergisches Asthma (Jackson und Johnston, 2010; Kim et al., 2010) induziert werden. Um diese Infektionen gar nicht erst entstehen zu lassen, muss die Epithelregeneration schnellstmöglich ablaufen.

Es gibt Hinweise aus *in vitro*-Kulturen, dass ein geschädigtes Atemwegsepithel schneller regeneriert, wenn bakterielle Bestandteile wie Lipopolysaccharide (LPS) anwesend sind (Shaykhiev et al., 2008). Denn Bakterien können über Toll-like Rezeptoren (TLRs) das Immunsystem aktivieren (Akira, 2003; Basu und Fenton, 2004). Jedoch ist unklar, wie LPS auf die Regeneration eines *in vivo* geschädigten Atemwegsepithels reagiert. Gibt es unterschiedliche Regenerationsantworten, wenn LPS während der Proliferation oder der Differenzierung verabreicht wird? Hypothetisch gesehen kann die Regeneration negativ beeinflusst werden, wenn zu einem frühen Zeitpunkt LPS das Immunsystem aktiviert. Dadurch können eventuell vorhandene Regenerationsprozesse inhibiert werden. LPS kann aber auch positiv auf die Regenerationsprozesse wirken, wie Shaykhiev et al., 2008 in Zellkultur gezeigt haben. Welchen Einfluss jedoch LPS auf die Regeneration des Atemwegsepithels *in vivo* hat, soll in dieser Arbeit untersucht werden.

Dazu muss ein geeignetes Modell für die Schädigung des Atemwegsepithels gefunden

werden, bei dem nach der Regeneration ebenfalls der zilienvermittelte Transport untersucht werden kann.

1.1 Aufbau der Atemwege

Anatomisch werden die Atemwege in obere und untere Atemwege eingeteilt. Die oberen Atemwege bestehen aus der Nasenhöhle, Mundhöhle, dem Rachen (Pharynx) und Kehlkopf (Larynx). Die unteren Atemwege bestehen beim Menschen aus der Trachea und den intrapulmonalen Atemwegen. Die intrapulmonalen Atemwege bestehen aus Bronchien, Bronchioli, Bronchioli terminales, Bronchioli respiratorii und Ductuli alveolares, die in die Sacculi alveolares münden. Es wird zwischen den luftleitenden Atemwegen und den am Gasaustausch beteiligten Atemwegen unterschieden. Die luftleitenden Atemwege beginnen bei der Nasenhöhle und enden mit den Bronchioli terminales, wo die zilienvermittelte Reinigung für den Schutz des Atemwegsepithels sorgt. In den weiter distal gelegenen Lungenanteilen sorgen Alveolarmakrophagen für die Immunabwehr von Fremdstoffen, die die zilienvermittelte Reinigung überwunden haben.

Das Innere der luftleitenden Atemwege ist mit einem zilientragenden Epithel ausgekleidet. Von der Trachea bis zu den Bronchien befindet sich beim Menschen ein mehrreihiges hochprismatisches Epithel aus Basal-, Becher- und zilientragenden Zellen sowie weiteren seltener vorkommenden Zelltypen. Die Bronchiolen besitzen dagegen ein einschichtiges hochprismatisches Epithel, das auch nicht-zilientragende, sekretorische Zellen sowie zilientragende Zellen besitzt.

Für Regenerationsprozesse sind die Bronchien des Menschen von besonderem Interesse, da sie am häufigsten in Kontakt mit Bakterien oder Viren und anderen Partikeln treten und dadurch Infektionen ausgelöst werden können. Um Regenerationsprozesse des Atemwegsepithels der Bronchien des Menschen bestmöglich untersuchen zu können, müsste dafür eigentlich humanes Material herangezogen werden. Da es so gut wie unmöglich ist, gesunde humane Bronchien zu bekommen, müssen die Regenerationsprozesse in etablierten Labortieren analysiert werden, die der Situation im Menschen nahe kommen. Die Maus ist als gut untersuchtes Labortier dafür sehr gut geeignet, weil bereits viele Regenerationsmechanismen in dieser Spezies geklärt wurden (Rawlins et al., 2006; Yildirim et al., 2008). Allerdings sind viele Untersuchungen an den intrapulmonalen kleineren Atemwegen der Maus durchgeführt worden (Van Winkle et al., 1995; Van Winkle et al., 1997; Reynolds et al., 2000). Morphologisch ist aber die Trachea der Maus dem menschlichen Bronchus am ähnlichsten. Sie entspricht den ersten sechs Atemwegsgenerationen der humanen Atemwege (Cole et al., 2010). Mit Ausnahme der Trachea sind die intrapulmonalen Atemwege der Maus in ihrem Aufbau den Bronchioli des

Menschen ähnlich.

Ein Vorteil der Trachea ist auch, dass sie einfach entnommen und ihr Epithel schnell und ohne großen Aufwand untersucht werden kann. Im Folgenden soll die Anatomie der Trachea der Maus genauer beschrieben werden.

Die Trachea der Maus ist ein elastisches Rohr, dessen Stützgerüst aus Knorpelspannen, Bindegewebe und glatter Muskulatur besteht. Im Inneren wird die Trachea mit einem mehrreihigen hochprismatischen Epithel ausgekleidet. Das zilientragende Epithel dient wie beim Menschen als Schutz vor unerwünschten eingeatmeten Substanzen (Gudis et al., 2010).

Im Atemwegsepithel können wie beim Menschen verschiedene Zelltypen wie zilientragende (Wanner et al., 1996), nicht-zilientragende sekretorische (Pack et al., 1981, Wanner et al., 1996), Basal- (Wanner et al., 1996), Bürsten- (Pack et al., 1981), Clara-like (Hong et al., 2001), neuroendokrine (Borthwick et al., 2001) und Becherzellen (Wanner et al., 1996) unterschieden werden.

Die drei am häufigsten vorkommenden Zelltypen im Trachealepithel der Maus sind die zilientragenden, nicht-zilientragenden und Basalzellen (Abbildung 1). Die zilientragenden und nicht-zilientragenden Zellen befinden sich jedoch nicht nur im Trachealepithel, sondern auch in den intrapulmonalen Atemwegen. Während die Basalzellen in der Trachea und am Beginn der intrapulmonalen Atemwege vorhanden sind.

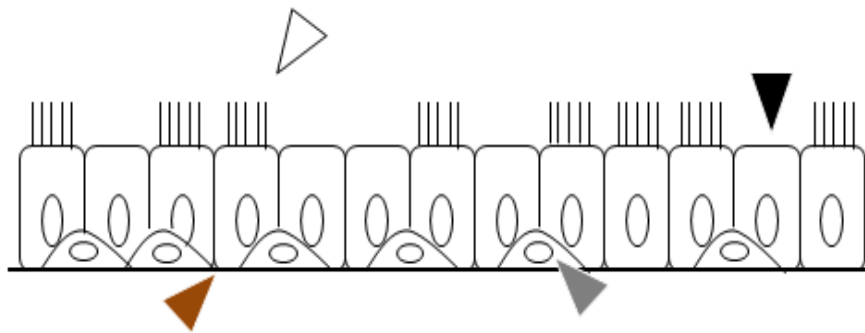


Abbildung 1 gesundes Trachealepithel mit zilientragenden (weiße Pfeilspitze), nicht-zilientragenden (schwarze Pfeilspitze) und Basalzellen (graue Pfeilspitze) Zellen auf der Basalmembran (braune Pfeilspitze).

Zilientragende Zellen

Zilientragende Zellen finden sich von der Trachea bis zu den distalen Atemwegen. Sie fallen durch ihre am apikalen Ende ins Lumen ragenden langen Zilien auf (Wanner et al., 1996). Die Zilien sind bewegliche Mikrotubuli-basierte filamentöse Organellen (Yu et al., 2008). Jede Zelle besitzt 200 Zilien mit einer durchschnittlichen Länge von 6 μm und einem Durchmesser von 0,1 bis 0,2 μm (Wanner et al., 1996). Mit Anstieg der Atemwegsgenerationen werden die zilientragenden Zellen durch kürzere ($< 6 \mu\text{m}$) und weniger als 200

Zilien charakterisiert (Wanner et al., 1996). Die Schichtdicke des Epithels nimmt in Richtung distaler Atemwege ab.

Im respiratorischen Epithel dienen die zilientragenden Zellen dem Abtransport von Fremdstoffen aus den Atemwegen. Elektronenmikroskopisch imponieren sie durch ihre weniger elektronendichte helle Erscheinung. Der Transkriptionsfaktor *forkhead box J1* (FoxJ1) wird in den zilientragenden Zellen exprimiert (Blatt et al., 1999; Gomperts et al., 2004; You et al., 2004; Yu et al., 2008). Dieser ist wichtig für die Ziliogenese (Brody et al., 2000).

Der Zilienaufbau ist eine komplexe Maschinerie aus neun äußeren und einem zentralen Mikrotubulipaar (9*2+2) (Gomperts et al., 2004). An den äußeren Mikrotubulipaaren befinden sich Dyneinarme, die die ATPase Aktivität für die Bewegung bereitstellen (Gomperts et al., 2004). Das dadurch entstehende Schlagmuster besteht aus einem effektiven (Vorwärtsschlag) und einem Erholungsschlag (Rückwärtsschlag) (Babu und Roy, 2013). Während der Vorwärts- und Rückwärts-Schläge übertragen Zilien kinetische Energie nach oben zur Schleimschicht (oder auch als Mukusschicht bezeichnet) (Henning et al., 2008). Durch die metachronische Bewegung der Zilien wird die Mukusschicht und darin eventuell enthaltene Partikel zum Rachen transportiert und anschließend verschluckt oder abgehustet (Sanchez et al., 2011). Dieser Mechanismus wird als mukoziliäre Reinigung der Atemwege bezeichnet.

Nicht-zilientragende Zellen (sekretorische Zellen)

Die nicht-zilientragenden, sekretorischen Zellen der Trachea ragen von der Basalmembran bis ins Lumen. An ihrer luminalen Oberfläche sitzen Mikrovilli. In den nicht-zilientragenden Zellen befinden sich freie Ribosomen und das Zytoplasma ist elektronendicht (Pack et al., 1981). In den intrapulmonalen Atemwegen wird die nicht-zilientragende, sekretorische Zelle als Clara-Zelle bezeichnet. 50% bis 60% der Zellen des murinen Atemwegsepithels sind sekretorische Zellen (Pack et al., 1981). Die nicht-zilientragenden, sekretorischen Zellen sezernieren ein 10 kDa schweres Protein namens CC10 (*clara cell* Protein) oder auch als CCSP (*clara cell specific protein*) bezeichnet (Stripp et al., 1993; Klug et al., 2000). Dieses Protein wird bei pulmonalen Inflammationen und Immunantworten sezerniert und wirkt antimikrobiell (Wang et al., 2013). Neben der Sekretion von CC10 sekretieren die nicht-zilientragenden Zellen außerdem Surfactant Proteine -A, -B und -D (Phelps und Floros, 1991; Kuan et al., 1992), Leukozytenproteaseinhibitoren (De Water et al., 1986), β -Galaktosidbindungslektin (Wasano und Yamamoto, 1989) und Trypsin-ähnliche Proteasen. Durch diese Sekretion werden Entzündungsreaktionen abgeschwächt und eine Schädigung des Epithels verhindert. Die Sekretion dient daher der Immunabwehr (Singh et al., 1990). Außerdem befinden sich metabolisch aktive Enzyme wie die Cytochrom P₄₅₀

Monooxygenase (CYP) in den nicht-zilientragenden Zellen (Shultz et al., 1997), die an der Verstoffwechslung wasserunlöslicher Stoffe beteiligt sind, wodurch diese Stoffe entgiftet werden können (Sutherland et al., 2012). Durch eine hohe Enzymaktivität werden die Zellen jedoch auch anfällig für eine Schädigung durch eine breite Vielfalt umweltbedingter Verschmutzungen (Plopper et al., 1992). Es gibt auch Hinweise, dass diese Zellen an der Regeneration des Atemwegsepithels der Bronchioli beteiligt sind (Singh und Katyal, 1997; Boers et al., 1999; Reynolds und Malkinson, 2010; Reynolds et al., 2010; Bustos et al., 2013).

Basalzellen

Zwischen den nicht-zilientragenden und zilientragenden Zellen sitzen die Basalzellen auf der Basalmembran. Sie finden sich von der Trachea ausgehend bis zum Beginn der Bronchien und fungieren als Progenitorzellen bei der Regeneration des Atemwegsepithels (Hong et al., 2004; Rock et al., 2009; Cole et al., 2010). In den intrapulmonalen Atemwegen der Maus sind nur in den sehr proximalen Anteilen Basalzellen vorhanden (Hong et al., 2004).

Circa 30% des Epithels der murinen Trachea machen die Basalzellen aus (Rock et al., 2009). Durch Hemidesmosomen sind die Basalzellen breit mit der Basalmembran verbunden (Boers et al., 1998) und erreichen nicht das Lumen. Die Basalzellen besitzen eine typisch pyramidenartige Form, wobei der Nukleus die größte Fläche einnimmt (Evans und Plopper, 1988). Sie exprimieren Zytokeratin 5 (CK5) und 14 (CK14) (Evans et al., 2001) sowie p75 (auch als *nerve growth factor receptor* (NGFR) bezeichnet) (Rock et al., 2009).

Mukoziliäre Reinigung

Mit dem Einatmen der Luft können Partikel unterschiedlicher Größe in die Atemwege gelangen und sich in unterschiedlichen Regionen des Epithels ablagern. Abhängig vom Ort der abgelagerten Partikel wird eine Reinigung durch verschiedene Mechanismen durchgeführt. Die mukoziliäre Reinigung ist ein Abwehrmechanismus des respiratorischen Systems, um inhalierte und eventuell schädigende Substanzen aus der Lunge zu befördern. Für einen korrekten Abtransport bewegen sich die Zilien immer in eine gezielte Richtung und zwar zum Larynx. Der zilienvermittelte Transport ist dabei von der Temperatur, der Feuchtigkeit sowie eventuelles Vorhandensein von Arzneistoffen abhängig (Mercke, 1974; Mercke und Torealm, 1976). Bei einer konstanten Temperatur von 37°C und einer relativen Feuchtigkeit von 100% wird eine Zilienschlagfrequenz von 10 bis 15 Hertz (Hz) bei Säugetieren gemessen. Eine Erhöhung der Zilienschlagfrequenz wird durch verschiedene Stimuli hervorgerufen (Nakahari, 2007). Wird beispielsweise ATP hinzugefügt, so wird die Zilienschlagfrequenz in nichtkultivierten Zellen auf 25 Hz erhöht (Nakahari, 2007). Durch diese erhöhte Zilienschlagfrequenz wird ebenfalls eine erhöhte mukoziliäre Reinigung

hervorgerufen. Daher korreliert die Zilienschlagfrequenz mit der Temperatur (Wanner et al., 1996). Kommt es zum Absinken der Temperatur von 37°C auf 20°C, so wird die mukoziliäre Reinigung aufgrund der verringerten Zilienschlagfrequenz herabgesetzt (Henning et al., 2008). Eine ebenfalls verminderte mukoziliäre Reinigung tritt auf, wenn die Feuchtigkeit um mindestens 20% verringert wird oder dem System Zilien- oder mukus-aktive Arzneimittel (wie Propranolol oder N-acetylcystein) verabreicht werden. Interessanterweise wird die mukoziliäre Reinigung und somit der Abtransport ebenfalls herabgesetzt, wenn nicht genügend zilentragende Zellen sowie vermehrt kürzere Zilien im regenerierenden Epithel vorhanden sind (Wanner et al., 1996).

1.2 Wirkung von LPS auf das Atemwegsepithel

Aufgrund der Beobachtung, dass LPS die Wundheilung *in vitro* beschleunigt, soll in diesem Absatz genauer auf die Wirkung von LPS eingegangen werden.

Beim Einatmen können Mikroorganismen aufgenommen werden und eine Infektion durch eine bereits defekte Epithelbarriere verursachen. Um eine Infektion gar nicht erst zu ermöglichen, muss die Regeneration des geschädigten Epithels möglichst schnell ablaufen. Epithelzellen besitzen Toll-like Rezeptoren (TLRs), die Mikroorganismen erkennen und eine Immunreaktion auslösen können. Es gibt mehrere TLR, wobei jeder der TLR andere Bestandteile von Mikroorganismen erkennt (Yang et al., 1998; Takeuchi et al., 1999; Lien et al., 2000; Takeda et al., 2003; Akira und Takeda, 2004). Es ist bekannt, dass LPS, also Bestandteile der äußeren Membran gram-negativer Bakterien, über den TLR 4 erkannt werden (Hoshino et al., 1999; Lien et al., 2000). Nach dem Eindringen von LPS in die Atemwege und Bindung an den TLR 4 werden pro-inflammatorische Mediatoren sowie antimikrobielle Faktoren ausgeschüttet (Jany et al., 1995; Chow et al., 1999; Sha et al., 2004; Guillot et al., 2004; Pace et al., 2007; Shaykhiev et al., 2008). Außerdem wird durch LPS der NF-κB-Signalweg induziert (Akira, 2003, Hayden und Ghosh, 2004).

LPS kann im Atemwegsepithel außerdem eine Entzündung, die mit einem Influx inflammatorischer Zellen (wie neutrophile Granulozyten und Makrophagen) einher geht, induzieren (Arsalane et al., 2000; Bolton et al., 2008). Diese Entzündung könnte auch die Wundheilung beeinflussen.

Wird das Atemwegsepithel durch LPS aktiviert, könnten zwei verschiedene Reaktionen auftreten, eine schnellere oder eine verzögerte Wundheilung. Die Ergebnisse von Shaykhiev et al. (2008) legen nahe, dass LPS einen positiven Effekt auf die Wundheilung eines geschädigten Atemwegsepithels *in vitro* hat und die Regeneration durch eine erhöhte Zellproliferation mit anschließender Zellmigration beschleunigt wird (Shaykhiev et al., 2008).

Allerdings gibt es auch Daten, die zeigen, dass LPS inhibierend auf die Zellproliferation wirken kann (Müller-Decker et al., 2005). Zwei unterschiedliche Arbeitsgruppen haben mit geringen Konzentrationen von LPS (0,5 µg/ml Müller-Decker et al., 2005; 1 µg/ml Shaykhiev et al., 2008) unterschiedliche Ergebnisse hinsichtlich der Proliferation von Epithelzellen in ihren *in vitro*-Versuchen beobachtet (Müller-Decker et al., 2005; Shaykhiev et al., 2008). Müller-Decker et al. (2005) untersuchten Epithelzellen der Zunge, während Shaykhiev et al. (2008) intrapulmonale Atemwegsepithelzellen untersucht haben.

Aufgrund der *in vitro*-Daten ist unklar, wie LPS die Regeneration des Atemwegsepithels *in vivo* beeinflusst. Dabei könnte der genaue Zeitpunkt zu dem LPS vorhanden ist, eine entscheidende Rolle spielen. So könnte es sein, dass LPS die Proliferation hemmt, dafür aber die Differenzierung bereits migrierter Zellen beschleunigt. Daher könnten die Ergebnisse unterschiedlich sein, je nachdem ob LPS während der Proliferation gegeben wird oder zu einem Zeitpunkt bei dem die Zellen bereits mit der Differenzierung begonnen haben. Des Weiteren ist unklar, ob LPS bei einer beschleunigten Regeneration langfristige Effekte auf Epithelfunktionen wie den zilienvermittelten Transport hat und ob LPS Auswirkungen auf die Zusammensetzung des Epithels hat.

Um die Auswirkung von LPS auf die Regeneration untersuchen zu können, muss daher ein geeignetes Modell zur Schädigung und Regeneration des Trachealepithels der Maus gefunden werden, das in seinem Zeitverlauf sehr gut charakterisiert ist. Da LPS auch zu einer Entzündung führt, die den Regenerationsprozess beeinflusst, sollte das Schädigungsmodell nicht zusätzlich zu einer Entzündung führen.

1.3 Modelle zur Schädigung und Regeneration des Epithels der Maus

Für die Untersuchung des Regenerationsprozesses eines geschädigten Trachealepithels der Maus stehen mechanische oder chemische Schädigungsmodelle zur Verfügung. Diese sollen im Folgenden vorgestellt und ihre Vor- und Nachteile erläutert werden.

Wie oben beschrieben, sollte das Modell folgende Anforderungen erfüllen: es muss gut reproduzierbar sein, soll keine offensichtliche Entzündung hervorrufen und der Zeitverlauf muss gut charakterisiert sein.

Mechanische Schädigung

Mittels einer speziell angefertigten Abtragungssonde kann das Epithel der Trachea lokal zerstört werden (Erjefält et al., 1995). Dabei wird das Epithel an einer Stelle abgetragen ohne die Basalmembran zu verletzen. Bei der Regeneration platten sich die Zellen innerhalb von 15 min an der Wundkante ab und migrieren über die abgetragene Basalmembran, so dass

nach 8 h ein flaches, undifferenziertes Epithel vorhanden ist (Erjefält et al., 1995). Basalzellen scheinen nicht zu migrieren. Sie tragen in diesem Modell wahrscheinlich im verbleibenden ungeschädigten Epithel durch Proliferation zur Reepithelialisierung bei. Die Proliferation von Epithelzellen findet 15 h nach Beendigung der Migrationsphase statt. 30 h nach Schädigung besitzt das Epithel 2 bis 3 Zellschichten und Oberflächenepithelzellen mit Mikrovilli. Nach 5 d ist ein Zilien-reiches Epithel und nach 15 d ein komplett regeneriertes Epithel vorhanden (Erjefält et al., 1995).

Vorteil der mechanischen Schädigung ist, dass alle Epithelzellen abgetragen werden und die Basalmembran nicht geschädigt wird. Außerdem ist der Zeitverlauf der Regeneration bekannt, so dass bereits vorweg Zeitpunkte für eine Intervention mit bakteriellen Bestandteilen getroffen werden könnten. Ein großer Nachteil ist, dass die Anwendung bislang nur in Meerschweinchen gezeigt wurde. Bisher ist diese Methode nicht bei Mäusen angewendet worden und aufgrund der geringeren Größe der Trachea der Maus ist unklar, ob sie bei der Maus erfolgreich etabliert werden kann.

Chemische Schädigung

Durch Einatmen chemischer Substanzen mit NO₂, SO₂ oder intraperitoneale Gabe von Naphthalin können ebenfalls Schädigungen hervorgerufen werden.

NO₂ und SO₂

NO₂ (Stickstoffdioxid) ist ein toxisches Gas. Es entsteht bei Verbrennungen fossiler Brennstoffe in Gas- und Kohlekraftwerken. Es ist ebenso Bestandteil bei Abgasen von Fahrzeugen. Das Einatmen von NO₂ kann in der Lunge verschiedene morphologische Veränderungen hervorrufen. Die kurzzeitige Aufnahme von 10 ppm führt bei Ratten zu keiner morphologischen Veränderung. Werden jedoch über einen Zeitraum von 24 h 10 ppm NO₂ verabreicht, so kommt es zu Zilienschäden und einer Hypertrophie des Bronchiolarepithels (Persinger et al., 2002). Noch höhere Konzentrationen (50 bis 150 ppm) von NO₂ bewirken den Tod der Versuchstiere. Der Tod beruht dabei auf einer extensiven pulmonale Schädigung, wobei das Atemwegsepithel abgetragen wird und sich Ödeme in der Lunge bilden (Persinger et al., 2002).

SO₂ (Schwefeldioxid) ist ein giftiges Gas, welches bei der Verbrennung von schwefelhaltigen Brennstoffen entsteht. Es ist einer der Hauptschadstoffe der Luftverschmutzung. Es schädigt in hohen Konzentrationen Mensch, Tier und Pflanzen. Der toxische Effekt von SO₂ ist dosis- und zeitabhängig. Bei niedrigen Konzentrationen wird zwar eine verminderte mukoziliäre Aktivität beobachtet, jedoch keine morphologischen Veränderungen (Cai et al., 2008). Werden über 3 d jeweils für 1 h 50 ppm SO₂ eingeatmet, so verursacht dieser Stoff eine

akute Atemwegsentzündung (Cai et al., 2008). Diese Entzündung kann eine akute oder chronische Bronchitis sein, mit der ein Verlust der Zilien und einer Epithelverschörfung einhergeht (Cai et al., 2008).

Nachteil der Verwendung von NO₂ und SO₂ als Modelle zur Schädigung des Atemwegsepithels ist, dass es in beiden Modellen zusätzlich zu einer starken Entzündungen der Atemwege kommt. Beide Gase werden auch verwendet, um Entzündungsreaktionen in den Atemwegen hervorzurufen. Ein weiteres Problem bei diesen Modellen ist, dass es kaum Hinweise gibt, wie der Regenerationsverlauf des Epithels ist.

Naphthalin

Naphthalin ist eine bityklische aromatische Verbindung (Hydrocarbon). Allgemein ist Naphthalin eine Komponente, die bei der Verbrennung von Holz oder Kohle entsteht und war früher Hauptbestandteil von Mottenkugeln. Im Zigarettenrauch und Rohöl ist Naphthalin ebenfalls enthalten (Stohs et al., 2002). Die intraperitoneale Gabe von Naphthalin ist ein etabliertes Schädigungsmodell für das Epithel der kleinen Atemwege. Es schädigt nach bisheriger Ansicht selektiv die Clarazellen (nicht-zilientragenden Zellen). Während die zilientragenden Zellen auf der Basalmembran verbleiben und sich abplatteln (Stripp et al., 1995; Van Winkle et al., 2002; Park et al., 2006; Yildirim et al., 2008; Oliver et al., 2009). Naphthalin wird allerdings nur toxisch, wenn es durch die Cytochrom P₄₅₀ Monooxygenase Isoform 2F2 (CYP2F2) in den Clarazellen verstoffwechselt wird (Plopper et al., 1992a; Plopper et al., 1992b; Buckpitt et al., 1992; Fanucchi et al., 1997; Plopper et al., 2001). Dabei wird Naphthalin in 1*R*,2*S*-Naphthalinoxid metabolisiert (Buckpitt et al., 1992). Ist dieser Prozess aktiv, vakuolisieren die Clarazellen und sind 24 h nach Naphthalin-Applikation vollständig aus dem Bronchiolarepithel abgelöst (Yildirim et al., 2008). Die Schädigung durch Naphthalin verursacht keine offensichtliche Entzündung in den Atemwegen. Die Regenerationsdauer des Atemwegsepithels nach einer Naphthalinschädigung in den intrapulmonalen Atemwegen beträgt maximal 21 d. Durch den Verlust der Clarazellen nach Naphthalin-Gabe, verbleiben in den intrapulmonalen Atemwegen die ausdifferenzierten zilientragenden Zellen abgeplattet auf der Basalmembran (Van Winkle et al., 1997; Park et al., 2006). Die Regeneration der Epithelzellen erfolgt aus den Zellen des NEB-microenvironment (Hong et al., 2001). Die neuroepithelialen Körperchen (NEBs) (Reynolds et al., 2000) bestehen aus Cluster von pulmonalen neuroendokrinen Zellen (PNECs) (Cutz et al., 1995). Das NEB-microenvironment besitzt Clara-like Zellen, die kein CYP exprimieren und somit nicht durch Naphthalin geschädigt werden (Reynolds et al., 2000). Die Clara-like Zellen und die PNECs proliferieren im Regenerationsprozess nach Naphthalinschädigung (Reynolds et al., 2000; Peake et al., 2000). Daher werden diese beiden Zelltypen als

Progenitorzellen im Bronchiolarepithel angesehen. Nach der Proliferation folgt die Migration und Differenzierung der Zellen (Hong et al., 2001).

Neuere Daten von Cole et al. (2010) zeigen, dass Naphthalin auch das Epithel der Trachea schädigen kann. Hier werden ebenfalls die nicht-zilientragenden Zellen, die das Protein CC10 tragen, durch Naphthalin geschädigt und verlassen das Epithel (Cole et al., 2010). Neben den nicht-zilientragenden Zellen gehen im Gegensatz zu den kleinen Atemwegen außerdem die zilientragenden Zellen verloren, so dass 3 d nach Naphthalin-Gabe nur noch Basalzellen die Basalmembran bedecken (Cole et al., 2010).

Cole und Mitarbeiter haben allerdings nur wenige Zeitpunkte der Regeneration untersucht (3 d, 6 d, 9 d und 13 d nach Naphthalin-Gabe), so dass der genaue Zeitverlauf der Regeneration aus diesen Daten noch nicht klar ist. Nach dieser Untersuchung ist die Regeneration des Trachealepithels nach 13 d abgeschlossen. Dies konnte immunhistochemisch durch Markierung mit Antikörper gegen CC10 für die nicht-zilientragenden Zellen, FoxJ1 für die zilientragenden Zellen sowie CK5 für die Basalzellen gezeigt werden (Cole et al., 2010).

Vorteil der Schädigung mittels Naphthalin ist, dass es ein gut untersuchtes Modell der kleinen Atemwege mit einer einfachen Applikation ist. Es reicht eine einmalige Gabe für eine Schädigung. Außerdem werden rein selektiv nur nicht-zilientragende Zellen durch die vorhandene Enzymaktivität der CYP2F2 geschädigt. Die Regeneration nach Naphthalin-Gabe wurde in den intrapulmonalen Atemwegen bisher gut untersucht. Bisher musste davon ausgegangen werden, dass Naphthalin nur das Epithel der kleineren Atemwege schädigt. Allerdings zeigt die Untersuchung von Cole et al. (2010), dass das Trachealepithel ebenfalls durch Naphthalin geschädigt wird.

Dagegen ist ein großer Nachteil, dass im Vergleich zu den intrapulmonalen Atemwegen bisher sehr viel weniger über den genauen Zeitverlauf der Regeneration bekannt ist, weil nur wenige Zeitpunkte (3 d, 6 d, 9 d und 13 d) nach der Schädigung untersucht wurden. Unklar ist, z.B. wann die erste Zellablösung nach Naphthalin-Gabe beginnt und wie der genauere Verlauf der Regeneration des Trachealepithels bis 6 d nach Naphthalin-Applikation erfolgt. Außerdem ist unklar, wann die Proliferation beginnt und wann sich die ersten Epithelzellen differenzieren. Dies müsste zunächst untersucht werden, um geeignete Zeitpunkte (Proliferation sowie Differenzierung) für eine Intervention mit bakteriellen Bestandteilen zu definieren.

Welches Modell ist für die geplante Untersuchung des Einflusses bakterieller Bestandteile auf die Regeneration des Atemwegsepithels am besten geeignet? Bei der mechanischen Schädigung ist vorteilhaft, dass alle Zelltypen zerstört werden und dass der Zeitverlauf der Regeneration bereits bekannt ist. Es ist aber unklar, ob diese Methode bei der Maus

zuverlässig etabliert werden kann und leicht durchzuführen ist. Schädigungen des Epithels mittels NO_2 oder SO_2 sind problematisch, weil sie mit einer starken Entzündung der Atemwege einhergehen, diese jedoch nicht erwünscht ist. Außerdem wurde der Zeitverlauf der Regeneration bisher nicht eingehend untersucht.

Dagegen hat die Schädigung mittels Naphthalin den Vorteil, dass das Epithel geschädigt wird, ohne eine offensichtliche Entzündung zu verursachen. Naphthalin kann zudem einfach appliziert werden. Da auch das Atemwegsepithel der Trachea geschädigt wird, scheint es das beste Modell zu sein, um Regenerationsprozesse sowie den zilienvermittelten Transport zu untersuchen. Allerdings ist hier noch unklar, wie die Schädigung in den ersten drei Tagen nach Naphthalin-Gabe verläuft bzw. wann genau die Proliferation und die Differenzierung der Epithelzellen beginnen. Bei Verwendung des Naphthalinmodells zur Schädigung des Trachealepithels der Maus muss daher der frühe Verlauf der Regeneration untersucht werden, um geeignete Zeitpunkte für eine Intervention zu definieren.

1.4 Ziel der Arbeit

Das Hauptziel der folgenden Arbeit ist, herauszufinden, welchen Effekt eine einmalige Applikation von LPS auf die *in vivo*-Regeneration des Trachealepithels hat. Bisher ist unklar, ob LPS schädigend oder nicht schädigend auf das regenerierte Trachealepithel wirkt. Dazu soll zunächst eine Schädigung des Epithels der Trachea durch Naphthalin hervorgerufen und der zeitliche Verlauf der Regeneration bis 15 d nach Naphthalin-Gabe analysiert werden. Anschließend werden zwei Zeitpunkte für die Intervention mit LPS definiert, zum Einen der Beginn der Proliferation und zum Anderen der Beginn der Zelldifferenzierung. Nachfolgend soll die Intervention mit LPS zu den definierten Zeitpunkten erfolgen. Danach soll untersucht werden, ob sich dadurch die Regeneration des Trachealepithels zu einem Zeitpunkt, wo ein erster neuer Epithelverband vorhanden ist, beschleunigt oder verzögert.

Außerdem soll nach 15 d die Funktion von Zilienschlag und Partikeltransport des Epithels untersucht werden, um herauszufinden, ob eine einmalige Gabe von LPS diese Funktionen beeinflusst.

Folgende Fragen sollen beantwortet werden:

1. *Wie erfolgt die Regeneration des Trachealepithels zu frühen Zeitpunkten nach Naphthalin-Gabe?*
2. *Wann finden Proliferation und Differenzierung des Epithels statt, um anschließend einmalig mit LPS genau zu diesen Zeitpunkten zu intervenieren?*
3. *Welchen Effekt hat eine einmalige Applikation von LPS während der Regeneration des Epithels?*

2 Material

2.1 Mausstamm

C57BL/6N (männlich, Alter 8-10 Wochen)

Janvier, Le Genest-Saint-Isle, Frankreich

2.2 Chemikalien, Reagenzien, Kits und Verbrauchsmaterialien

Chemikalien

Aceton	Roth, Karlsruhe
Araldit	Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim
Araldit M	Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim
Araldit M Beschleuniger 960	Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim
Araldit M Härter 964	Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim
Azur II	Merck, Darmstadt
Bleicitrat (Kontrastierlösung)	Laurylab über Leica, Nussloch
Borax 99%	Sigma-Aldrich, Steinheim
CaCl ₂ 2xH ₂ O	Merck, Darmstadt
Dibutylphtalat ≥98,0% GC	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dimethylarsinsäure Natriumsalz ≥97%	Merck, Darmstadt
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma, Steinheim
Ethanol	Roth, Karlsruhe
fluoreszenzfreies Glycerin	Merck, Darmstadt
D-(+)-Glucose	Sigma, Steinheim
Glutaraldehyd	Merck, Darmstadt
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)	Roth, Karlsruhe
Hoechst (Bisbenzimid H 33258)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isofluran	Baxter, Unterschleißheim
Isopentan (2-Methylbutan)	Sigma-Aldrich, Steinheim
KCl p.a.	Merck, Darmstadt
Leitsilber	Plano GmbH, Wetzlar
MgCl ₂ p.a.	Merck, Darmstadt
Methylenblau	Merck, Darmstadt
Mowiol 4-88	Höchst, Frankfurt
NaCl ≥99,5% p.a.	Roth, Karlsruhe
NaH ₂ PO ₄ >99% p.a.	Merck, Darmstadt

NaOH >98%	Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim
Naphthalin ≥99%	Aldrich Chemistry, Steinheim
Osmiumtetroxid (OsO ₄ , 1-2%)	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Propylenoxid	Aldrich Chemistry, Steinheim
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Tris-HCl ≥99% p.a.	Roth, Karlsruhe
Uranylacetat	Laurylab über Leica, Nussloch

Reagenzien für cDNA Synthese und qRT-PCR

ATP (1 mM) (10 ⁻² in A. dest. gelöst)	Sigma, Steinheim
dNTP-Mix (10 mM eingesetzt)	peglab, Erlangen
qPCR Mastermix Plus	Fermentas, Darmstadt
Taq Man® Universal PCR Master Mix,	
No AmpErase® UNG (Taq/MM)	Life Technologies, Darmstadt

Kits

DNase I-Verdau	Sigma, St.Louis, USA
SuperScript™ II RNase H ⁻ Reverse Transcriptase	Invitrogen, Darmstadt
Lightning-link™ Atto488 conjugation kit	Innova Biosciences, Cambridge, UK
RNA-Isolationskit: innuPREP RNA Mini Kit	analytic jena, Jena
Sylgard 184-Silicone elastomer Kit	Dow Corning GmbH, Wiesbaden

Verbrauchsgegenstände

Deckgläschen (24x40 und 24x50)	Menzel-Gläser, Braunschweig
Delta T Culture Dish-Kulturschale	Bioprotechs Inc., Butler, USA
FLOQSwab (sterile, 80 mm)	COPAN Flock Technologies, Reinfeld
Insektennadeln	Plano GmbH, Wetzlar
Kanüle (0,55 x 25 mm BL/LB) 24G x 1''	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Kanüle (20 GA, 1.26IN, 1.1 x 32 mm)	BD Bioscience, Heidelberg
Kork Plättchen	Bauhaus Baumarkt, Lübeck
Kupfer-Netze	Plano GmbH, Wetzlar
Leit-Tabs REM	Plano GmbH, Wetzlar
Low Profile Microtome Blades	Leica Biosystems, Nussloch
Minutien (Stainless Steel 20)	Bioform, Nürnberg
Precleaned Micro Slides X-tra™ Adhesive (26x76x1,0 mm)	Surgipath, Richmond, USA

Rasierklingen	Wilkinson, Solingen
Spritze (Omnifix®, 1 ml)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Spritze (Injekt, 5 ml)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Gold-Targets (Sputter Zubehör)	Plano GmbH, Wetzlar
Vierseitiges Glasschnitt-Streckplättchen	Leica Biosystems, Nussloch
24-Well Culture Plate (sterile, with lid)	Roth, Karlsruhe

Sonstiges

A. dest. (Ampuwa® Spüllösung Plastipu®)	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Dynabeads (4,5 µm Durchmesser)	Invitrogen, Darmstadt
DePeX Eindeckmittel	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Lipopolysaccharid (<i>E. coli</i> , 0111:B4)	Sigma Aldrich, Steinheim
Maiskeimöl	Mazola, Hamburg
Spezialkleber REM	Plano GmbH, Wetzlar
Tissue Freezing Medium (Einbettmedium)	Leica Microsystems, Nussloch

2.3 Puffer und Lösungen

4% gepuffertes Paraformaldehyd (PFA):

80 g Paraformaldehyd
in 1000 ml A. dest. bei 80°C lösen.
Tropfenweise 5 N NaOH hinzufügen bis
die Lösung klar ist und abkühlen lassen.
Anschließend filtrieren.
Doppelte Konzentration PBS (1 l = 400 ml
Stammlösung + 600 ml A. dest.)
dazugeben und gut mischen.
pH-Wert auf 7,4 mit 1 N NaOH einstellen.

2% gepuffertes PFA:

100 ml 4% PFA
100 ml PBS
Mischen.

Natrium-Cacodylatpuffer (0,2 M):

42,8 g Dimethylarsinsäure Natriumsalz
68,46 g Saccharose
Auffüllen mit 1000 ml A. dest.
pH-Wert auf 7,3 mit 1 N NaOH einstellen.

0,2 mol Tris-Puffer für Mowiol:

2,90 g Tris-HCl
in 120 ml A. dest. lösen.
pH-Wert auf 8,5 mit 1 N HCl einstellen.

Gepuffertes Mowiol:

12 g Mowiol 4-88
30 ml A. dest.
60 ml Tris-Puffer (0,2 mol/l) mischen und
über Nacht rühren. Danach bei 95°C für
45 min erhitzen und langsam auf 50°C
abkühlen lassen.
30 g fluoreszenzfreies Glycerin vorsichtig
einrühren.
pH-Wert auf 8,5 mit 1 N NaOH einstellen.

Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)-Stammlösung:

90 g NaCl
2,704 g NaH₂PO₄ mit H₂O
28,794 g Na₂HPO₄ mit 12x H₂O
in 2000 ml A. dest. lösen.
pH-Wert auf 7,4 mit 1 N NaOH einstellen.
Verwendet wurde PBS-Gebrauchslösung:
1:5 = 100 ml Stammlösung + 400 ml A.
dest. (0,001 M)

HEPES-Ringer Lösung:

0,418 g KCl (5,6 mM)
7,97 g NaCl (136,4 mM)
0,2033 g/l MgCl₂ (1 mM)
0,3234 g/l CaCl₂ (2,2 mM)
1,98 g Glucose (11 mM)
2,38 g HEPES (10 mM)
Die Reagenzien werden in 1000 ml A.
dest. gelöst und anschließend der pH-
Wert auf 7,4 mit 1 N NaOH tropfenweise
eingestellt.

10% Paraformaldehyd für Fixierlösung nach Monti-Graziadei:

10 g Paraformaldehyd
in 100 ml A. dest.
unter Rühren erhitzen (80°C). Die trübe
Lösung tropfenweise mit 1 N NaOH
klären.

Fixierlösung nach Monti-Graziadei:

156 ml Natrium-Cacodylat-Puffer 0,2 mol
25 ml Glutaraldehyd 25%
19 ml Paraformaldehyd 10%
3 ml CaCl₂ 3%
pH-Wert auf 7,35 mit 1 N HCl einstellen,
mit A. bidest. auf 312 ml auffüllen.

Araldit:

10 ml Araldit M
10 ml Araldit M Härter 964
0,2 ml Dibuthylphtalat
0,4 ml Araldit Beschleuniger mischen.

Schnellfärbung nach Richardson (Methylenblau-Azur II):

Erste Lösung: 1 g Azur II
in 100 ml A. dest. mischen.

Zweite Lösung: 1 g Methylenblau
1 g Borax
40 g Saccharose
in 100 ml A. dest. mischen.

Beide Lösungen 1:1 vermischen.

20% Saccharose:

20 g Saccharose
in 100 ml A. dest.
unter Rühren lösen.

PBS mit Tissue Freezing Medium:

100 ml Gebrauchslösung PBS
100 ml Tissue Freezing Medium
unter Rühren lösen.

2.4 Primer und fluoreszenzmarkierte Sonden

Random Primer (Hexamer)

MWG-Biotech, Ebersberg

Die spezifischen Primer für die quantitative Real-Time PCR wurden von mir selbst mit dem Programm *Clone Mgr Suite 7* erstellt. Hierbei wurde zunächst die Sequenz von *Mus Musculus* (für Maus) für das jeweilige Gen über NCBI herausgesucht und in das Programm exportiert. Anschließend wurde jeweils ein Bereich für einen forward Primer sowie einen reverse Primer gesucht. Anschließend wurden die Primersequenzen auf ihren GC-Gehalt (50% bis 55%) sowie auf die Temperatur analysiert (ca. 60°C). Danach wurde zwischen den beiden Primersequenzen die Sequenz für die Sonde ermittelt. Diese sollte eine höhere Temperatur als die Primer haben und ca. 5-10 Basen länger sein. Nachdem alle Sequenzen ermittelt wurden, wurden diese über biomers.net bestellt.

CC10-Primer (CC10 exprimiert in nicht-zilientragenden sekretorischen Zellen)

CC10 forward 5'- TGGATACCCTCCCACAAGAG -3'

CC10 reverse 5'- GAGACACAGGGCAGTGACAA -3'

CC10-Sonde 5'- (6-FAM) CATCATGAAGCTCACGGAGAAAATCCT (Tamra) -3'

CYP2F2-Primer (CYP2F2 exprimiert in nicht-zilientragenden sekretorischen Zellen)

CYP2F2 forward 5'- ACGCTGGAAGACCGTACATC -3'

CYP2F2 reverse 5'- TGAGGCGTCTTGAAGTGGTC -3'

CYP2F2-Sonde 5'- (6-FAM) TGATCCACGAAGTGCAACGCTTTGCTGAC (Tamra) -3'

FoxJ1-Primer (FoxJ1 exprimiert in zilientragenden Zellen)

FoxJ1 forward 5'- TCCTATGCCACTCTCATCTG -3'

FoxJ1 reverse 5'- CAAAGGCAGGGTGGATGT -3'

FoxJ1-Sonde 5'- (6-FAM) CAGAATTCCATCCGCCACAACCTG (Tamra) -3'

CK5-Primer (CK5 exprimiert in Basalzellen)

CK5 forward 5'- GGAGCTGGCTCTCAAAGATG -3'

CK5 reverse 5'- TCCAGCAGCTTCCTGTAGGT -3'

CK5-Sonde 5'- (6-FAM) CCTGCAGAAGGCCAAGCAGGAC (Tamra) -3'

MLN51-Primer (MLN51 als housekeeping Gen)

MLN51 forward 5'- CCAAGCCAGCTTCTTG -3'

MLN51 reverse 5'- TAACGCTTAGACTCTG -3'

MLN51-Sonde 5' – (6-FAM) CACGGGAACTTCGAGGTGTGCCTAAC (Tamra) -3'

2.5 Antikörper

2.5.1 primäre Antikörper

<i>Antigen</i>	<i>Wirt</i>	<i>Klonalität</i>	<i>Eingesetzte Konzentration</i>	<i>Hersteller</i>
CC10	Kaninchen	polyklonal	1:3000	J. Klug, Gießen
acetyliertes Tubulin	Maus	monoklonal Klon 6-11B-1	0,0025 µg/µl	Sigma, Steinheim
phospho Histon H3 (Ser 10)	Kaninchen	polyklonal	0,0025 µg/µl	Millipore, Schwalbach
p75 NGF Receptor	Kaninchen	polyklonal	0,1125 µg/µl	Abcam, Cambridge, UK

2.5.2 sekundäre Antikörper

<i>Antigen</i>	<i>Wirt</i>	<i>Konjugat</i>	<i>Eingesetzte Konzentration</i>	<i>Hersteller</i>
Kaninchen IgG	Esel	Alexa 555	0,0025 µg/µl	Invitrogen, Karlsruhe

2.6 Präparierbesteck

Große Schere: Standard Pattern straight sharp/blunt	FST (Fine Science Tools), Heidelberg
Rundscherer: Fine Iris Scissors, curved, sharp/sharp, 10,5 cm	FST, Heidelberg
Mikroscherer: Vannas, straight, cutting edge: 4 mm, tip diameter: 0,15 mm, 10,5 cm	FST, Heidelberg
Pinzette: Narrow Pattern, straight serrated	FST, Heidelberg
Pinzette: Narrow Pattern, curved serrated	FST, Heidelberg
Pinzette: Dumont #4 (Rustless, Dumoxel)	FST, Heidelberg
Pinzette: Dumont #5 (Titanium)	FST, Heidelberg

2.7 Geräte

Bezeichnung	Funktion	Hersteller
ABI PRISM 7000	Thermocycler für quantitative Real-Time PCR	Applied Biosystems, Darmstadt
ACHROPLAN (20x/0,50)	Eintauchobjektiv	Zeiss, Göttingen
ACHROPLAN (40x/0,80)	Eintauchobjektiv	Zeiss, Göttingen
ACHROPLAN (20x/0,75)	Objektiv	Zeiss, Göttingen
Axioskop 2 plus	Mikroskop	Zeiss, Göttingen
Axioskop 2 FS plus	Mikroskop	Zeiss, Göttingen
Concentrator 5301	Speedvac	Eppendorf, Hamburg
CM3050 S	Kryostat	Leica Micorsystems, Wetzlar
Critical point Anlage	Kritische Punkt Trocknung	Polaron, München*
Delta T4 Dish Controller	Temperaturregler	Bioptechs, Ascheberg
DP72	Kamera	Olympus, Münster
JEOL 1011	Transmissionselektronenmikroskop	JEOL, Echingen
LSM 510 Meta	Konfokales Mikroskop	Zeiss, Göttingen
Morada	Kamera	Olympus, Münster
Megafuge 1.0 R	Zentrifuge	Heraeus, München
SMX-150 M	Kamera	ehd imaging, Damme
SEM 505	Rasterelektronenmikroskop	Philips, Eindhoven, NL
SCD 040	Sputteranalge	Balzers Union, Lichtenstein
SEM coating system	Sputteranalge	Polaron, München ¹
Titramax 100	Rüttler	Heidolph, Lübeck
Tischzentrifuge 5452	Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Ultracut E	Ultra-Mikrotom	Reichert-Jung, Heidelberg

¹ Anmerkung: Firma existiert nicht mehr

3 Methoden

3.1 Inkubation der Trachea mit Naphthalin und Vehikel *ex vivo*

Für die *ex vivo* Versuche wurde die Maus durch eine Überdosis Isofluran getötet. Der Thorax der Maus wurde am Sternum eröffnet, so dass die Rippen frei lagen. Durch Entfernen von Rippen, Herz, Thymus, Speicheldrüsen und Muskulatur wurde die Trachea freigelegt. Für die Entnahme der Trachea wurde diese unterhalb des Larynx und an den beiden Hauptbronchien abgetrennt, entnommen und in eine mit 1 ml HEPES-Ringerlösung gefüllte Kulturschale (Delta T Culture Dish) gegeben. Die Trachea wurde entlang des *Musculus trachealis* eröffnet und mit dem Epithel nach oben aufgeklappt. Die Tracheenenden wurden mittels Minutien in der Kulturschale, die mit Sylgard gefüllt war, befestigt. Anschließend wurde die Trachea mit Naphthalin (200 µg (gelöst in 20 µl DMSO) in 1 ml HEPES-Ringerlösung) oder Vehikel (20 µl DMSO in 1 ml HEPES-Ringerlösung) für 2 bis 4 h bei 37°C inkubiert. Die Trachea wurde anschließend mit Fixans nach Monti-Graziadei fixiert, für die Rasterelektronenmikroskopie (REM) vorbereitet (siehe unten) und mittels Rasterelektronenmikroskopie untersucht.

3.2 Tierversuchsgenehmigung

Das Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein genehmigte die vorgenommenen Tierversuche unter dem Titel „Regeneration des Atemwegsepithels der Trachea der Maus unter Einfluss von mikrobiellen Bestandteilen“. Die Tierversuchsgenehmigung wurde unter folgender Nummer geführt: V312-72241-122-1 (103-10).

3.3 Versuchsaufbau der *in vivo* Naphthalin-Experimente

Den Tieren wurden 200 μl (300 $\mu\text{g/g}$ Mausgewicht) Naphthalin (in Maiskeimöl gelöst) oder 200 μl Maiskeimöl (Kontrollen) intraperitoneal injiziert. Anschließend wurden die Tiere zu bestimmten Zeitpunkten (12 h, 24 h, 48 h, 60 h, 3 d, 4 d, 5 d, 6 d und 15 d) getötet, die Tracheen und Lungen entnommen und weiter verarbeitet (Abbildung 2).

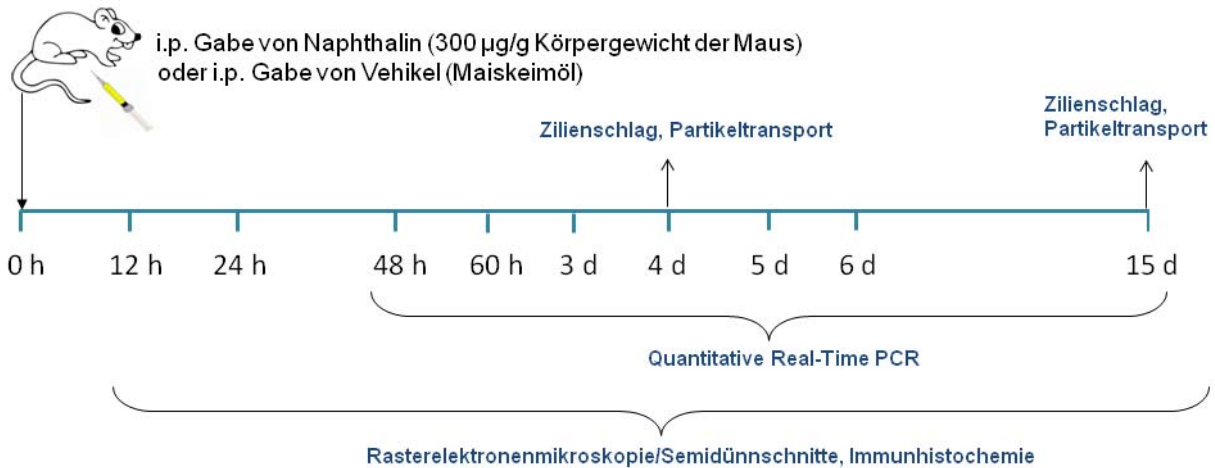


Abbildung 2: Schema der durchgeführten Analysen. Den Mäusen wurde 300 $\mu\text{g/g}$ Mausgewicht Naphthalin oder Vehikel intraperitoneal injiziert und die Trachea 12 h, 24 h, 48 h, 60 h, 3 d, 4 d, 5 d, 6 d und 15 d nach Applikation entnommen und untersucht. Dabei wurden folgende Untersuchungen durchgeführt: Rasterelektronenmikroskopie, Semidünnschnitte, Immunhistochemie, quantitative Real-Time PCR, Bestimmung des Zilienschlags sowie der zilienvermittelten Transportgeschwindigkeit.

Für jeden Zeitpunkt gingen jeweils 6-10 Tiere pro verwendete Methode (6-10 Tiere für Kontrollen sowie 6-10 Tiere für Naphthalin) in die Versuche ein. Es wurden für die Zeitpunkte 12 h bis 15 d Rasterelektronenmikroskopie/Semidünnschnitte und Immunhistochemie (IHC) angewandt. Zusätzlich wurden jeweils 6-8 Tiere für die Zeitpunkte 48 h bis 15 d mittels quantitativer Real-Time PCR (qRT-PCR) untersucht. Für die Untersuchung des Partikeltransportes (4 d und 15 d) wurden 3-6 Tiere verwendet (Tabelle 1).

Tabelle 1 Übersicht zu den beanspruchten Tieren für die einzelnen Methoden und Zeitpunkte.

Methoden	Zeitpunkte	Kontroll-Tiere	Naphthalin-behandelte Tiere
REM/Semidünnschnitte	12 h bis 15 d	6-9	6-9, insgesamt 70
Immunhistochemie	12 h bis 15 d	6-10	6-10, insgesamt 70
qRT-PCR	48 h bis 15 d	6-8	6, insgesamt 44
Transport	4 d und 15 d	3-6	3-6, insgesamt 9

3.4 Präparation von Trachea und Lunge

Für die Entnahme der Tracheen und Lungen wurde die Maus mit einer Überdosis an Isofluran getötet. Der Thorax der Maus wurde am Sternum eröffnet, so dass die Rippen frei lagen. Durch Entfernen von Rippen, Herz, Thymus, Speicheldrüsen und Muskulatur wurden Trachea und Lunge freigelegt. Anschließend wurden Trachea und Lunge entnommen und wie unten beschrieben weiter verarbeitet (Rasterelektronenmikroskopie sowie Semidünnschnitte, Immunhistochemie und quantitativer Real-Time PCR).

3.5 Rasterelektronenmikroskopie und Semidünnschnitte

Für die REM-Präparate und Semidünnschnitte wurden die Lungen und die Tracheen entnommen. Zunächst wurde die Lunge von der Trachea an der Bifurkation getrennt und der linke Lungenlappen mit Hilfe einer Rasierklinge in Scheiben geschnitten und anschließend in Fixierlösung nach Monti-Graziadei für 3 Tage bei 4°C fixiert. Die Trachea wurde längs des *Musculus trachealis* geöffnet, aufgeklappt und mit Minutien auf Kork gespannt, so dass das Epithel nach oben zeigte. Anschließend wurde die auf Kork gespannte Trachea ebenfalls in Monti-Graziadei bei 4°C für 3 Tage fixiert. Von den Tracheen wurden REM-Präparate sowie Semidünnschnitte und von den Lungen nur Semidünnschnitte angefertigt.

3.5.1 Einbettung für Semidünnschnitte

Nachdem die Tracheen/Lungen 3 Tage bei 4°C fixiert wurden, erfolgten die Kontrastierung, Entwässerung und Einbettung. Dabei wurden die Gewebestücke zunächst mit Cacodylatpuffer mehrmals für 1 min gewaschen. Anschließend wurden die Gewebestücke für 1 h in 1-2% OsO₄ inkubiert. Das OsO₄ wurde danach solange mit Cacodylatpuffer ausgewaschen, bis die Spüllösung klar und farblos war. Als nächstes wurden die Gewebestücke entwässert. Bei der Entwässerung wurden die Gewebestücke in einer aufsteigenden Ethanolreihe (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% und 100%) für jeweils 1,5 h inkubiert. Danach wurden die Tracheen für 2 x 15 min in Propylenoxid belassen. Anschließend erfolgte eine Inkubation für jeweils 1 h in Araldit-Propylenoxid-Gemischen 1+3, 1+1 und 3+1 und abschließend in Araldit. Die Gewebestücke wurden bei 58°C mindestens 2 Tage auspolymerisiert.

3.5.2 Erstellen von Semidünnschnitten sowie Färbung

Zunächst wurden die auspolymerisierten Blöcke manuell unter einer Stereolupe mit einer Rasierklinge getrimmt und mit einem Glasmesser in 700 bis 800 nm dicke Dünnschnitte

geschnitten. Die Schnitte wurden anschließend auf Objektträger aufgezogen und bei 60-80°C getrocknet. Anschließend wurden die Schnitte mit Schnellfärbung nach Richardson für 1-5 min bei ebenfalls 60-80°C gefärbt, mit A.dest gespült, getrocknet und mit DePeX eingedeckelt. Anschließend wurden die gefärbten Schnitte von Tracheen und Lungen am Mikroskop ausgewertet und mit Hilfe der DP72 Kamera dokumentiert.

3.5.3 Präparation für REM

Bei der Präparation der Tracheen für das REM erfolgte zunächst wie bei der Einbettung für die Semidünnschnitte die Kontrastierung in OsO₄. Anschließend wurden die Proben über eine aufsteigende Acetonreihe (30% bis 100%) entwässert. Hierfür wurden die Proben in kleine Kupfer-Netze verpackt. Anschließend erfolgte eine Kritische-Punkt-Trocknung bei 45-48°C für 30 bis 60 min. Die getrockneten Proben wurden aufgeklebt und mit Gold besputtert. Danach wurden die Proben im REM untersucht.

3.5.4 Auszählung der Zellanzahl über dem Band- und Knorpelbereich der Trachea

Für die Bestimmung der Anzahl nicht-zilientragender, zilientragender und Basalzellen wurden die Semidünnschnitte der Tracheen herangezogen (siehe 5.2). Hierfür wurden zunächst jeweils 200 Zellen über dem Band bzw. über dem Knorpel einer Trachea ausgezählt und der prozentuale Anteil der nicht-zilientragenden, der zilientragenden und der Basalzellen ermittelt.

3.5.5 Bestimmung der Fläche zilientragender und nicht-zilientragender Zellen

Für die Bestimmung der Fläche zilientragender und nicht-zilientragender Zellen wurden zufällig fünf verschiedene REM-Bilder einer Trachea der 15 d Tiere, die nach 60 h LPS bekommen haben, mit dem Programm *ImageJ* analysiert. Dabei entsprach jedes einzelne Bild einer Fläche von 100%. Anschließend wurde der prozentuale Anteil der Flächen der zilientragenden Zellen sowie der nicht-zilientragenden Zellen ermittelt. Zusätzlich wurde bei den zilientragenden Zellen der Anteil der Fläche analysiert, in dem zilientragende Zellen mit kurzen Zilien vorkamen. Dabei wurde visuell zwischen eindeutig kurzen Zilien und normal langen Zilien unterschieden (siehe Ergebnisse 4.7, Abbildung 43).

3.6 Immunhistochemische Färbung

Für die IHC wurden Lungen und Tracheen entnommen. Zunächst wurde ein kleines Loch in den lungennahen Teil der Trachea geschnitten. Durch dieses Loch wurde eine Kanüle (20 GA, 1,26IN 1.1 x 32 mm) eingeführt und ein 2 ml Gemisch aus PBS und Tissue Freezing Medium in die Lunge injiziert. Nach Entfernen der Kanüle und Verschließen des Loches mittels einer gebogenen Pinzette wurde die Lunge entnommen und sofort in -80°C kaltem Isopentan tiefgefroren. Die Trachea wurde ebenfalls entnommen und in 2% PFA für 25 min fixiert. Nach der Fixierung wurde die Trachea 3 x für 10 min in PBS gewaschen und dann in 20% Saccharose für 1 h inkubiert. Nach der Inkubation mit Saccharose wurde die Trachea ebenfalls mit Tissue Freezing Medium befüllt und ummantelt und in -80°C kaltem Isopentan tiefgefroren. Anschließend wurden Kryostatschnitte angefertigt, die dann immunhistochemisch analysiert werden konnten. Die Gewebelagerung erfolgte bei -80°C .

3.6.1 Anfertigung von Kryostatschnitten aus Gewebe

Für die Anfertigung von Kryostatschnitten wurden die tiefgefrorenen mit 2% PFA fixierten Tracheen sowie die unfixierten Lungen zunächst im -20°C kalten Kryostat getrimmt. Von den Geweben wurden anschließend 10 μm dicke Kryostatschnitte angefertigt, auf Objektträger aufgezogen und getrocknet. Anschließend konnten die getrockneten Schnitte mittels IHC untersucht werden.

3.6.2 Direktmarkierung von Antikörpern

Der Antikörper gegen acetyliertes Tubulin wurde mit dem *Lightning-link™ Atto488 conjugation kit* markiert. Hierbei wurden 100 μl Antikörper mit 10 μl LL-Modifier Reagenz vermischt und zu dem Farbstoff (Atto 488) gegeben. Die Inkubation erfolgte ü. N. bei Raumtemperatur. Am darauffolgenden Tag wurden 10 μl LL-Quencher FD Reagenz zum Antikörper-Farbstoff-Gemisch zugegeben, vermischt und im Dunkeln bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert. Anschließend konnte der direktmarkierte Antikörper verwendet werden. Die Lagerung erfolgte bei -20°C .

3.6.3 Immunhistochemische Färbung der Kryostatschnitte

Für die Färbung wurden die tiefgefrorenen Schnitte von den Tracheen direkt für 10 min in Aceton (-20°C) inkubiert und anschließend für 10 min luftgetrocknet. Die Objektträger mit den Lungenschnitten wurden zunächst getrocknet und anschließend 10 min in 4% PFA unter leichtem Schütteln inkubiert. Danach wurden die Lungenschnitte 3 x 10 min in PBS unter

leichtem Schütteln gewaschen, danach für 10 min in Aceton (-20°C) fixiert und luftgetrocknet. Die Schnitte wurden mit der 1. Antikörpermischung (entweder anti-CC10 mit anti-acetyliertem Tubulin, anti-p75 mit anti-acetyliertem Tubulin oder anti-phospho Histon mit anti-acetyliertem Tubulin) bedeckt und über Nacht bei Raumtemperatur in der Feuchtekammer inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Objektträger 3 x in PBS für je 10 min unter leichtem Schütteln gewaschen und anschließend für eine Stunde mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Objektträger wieder 3 x 10 min in PBS unter leichtem Schütteln gewaschen. Bei einer Zellkernfärbung mit Höchst wurden die Schnitte auf den Objektträgern mit Hoechst H 33258 (1:10000) für 10 min benetzt und danach 3 x 10 min mit PBS gewaschen. Die Objektträger wurden danach mit Mowiol eingedeckelt. Anschließend wurden die Tracheen und Lungen am kofokalen Laserscanningmikroskop ausgewertet.

3.6.4 Auszählung der proliferierenden Zellen

Für die Ermittlung der Zellproliferation wurde von 200 zufällig ausgewählten Epithelzellen der Anteil Histon-positiver Zellkerne ausgezählt und der prozentuale Anteil ermittelt. Es wurden insgesamt vier bis sechs Tracheen ausgewertet.

3.7 Quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion

Für die qRT-PCR wurde die Trachea aus der Maus entfernt. Die Trachea wurde längs des *Musculus trachealis* geöffnet, aufgeklappt und mit Minutien gespannt, so dass das Epithel nach oben zeigte. Anschließend wurde die Trachea zweimal mit je 1 ml HEPES-Ringer-Lösung gespült. Das Epithel wurde mit einem COPAN-Bürstchen abgenommen und in 700 µl Lysis-Puffer (*innuPREP RNA Mini Kit*) resuspendiert. Anschließend wurden die Proben bis zur RNA-Isolierung und reversen Transkription bei -80°C gelagert.

3.7.1 RNA-Isolation

Für die RNA-Isolation wurden die Proben (Epithel der Trachea in Lysis-Puffer) aufgetaut. Anschließend wurden 700 µl Ethanol (70%) zugeben und 10x vorsichtig mit der Pipette vermischt. Danach wurde die Lösung auf den Spin Filter R gegeben und für 2 min bei 12000 rpm (Tischzentrifuge 5452) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Danach wurden die restlichen 700 µl auf den Spin Filter R gegeben und ebenfalls für 2 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurden im nächsten Schritt 500 µl *Washing Solution HS* auf den Spin Filter R pipettiert und für 1 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und es wurden 700 µl *Washing*

Solution LS auf den Spin Filter R gegeben und für 1 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und der Spin Filter R für 2 min bei 12000 rpm getrocknet. Die RNA wurde durch Hinzufügen von 60 µl RNase-freiem Wasser auf den Spin Filter R und anschließender Inkubation für 1 min sowie Zentrifugation für 1 min bei 8000 rpm eluiert. Anschließend wurde das Eluat nochmals auf den Spin Filter R gegeben, 1 min inkubiert und erneut 1 min bei 8000 rpm eluiert (für 15-30% mehr Gesamt-RNA).

3.7.2 cDNA-Synthese

Zunächst wurde die isolierte RNA in der Speedvac aufkonzentriert. Dazu wurden in den 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß-Deckel 4 Löcher mit einer Kanüle gestochen und das Eluat anschließend für 20 min bei 60°C eingedampft, so dass ca. 8 µl Lösung übrig bleiben. Für den Verdau eventuell vorhandener DNA wurden 1 µl 10x DNase-Puffer und 1 µl DNase-I-Enzym hinzugefügt, vermischt und bei RT für 15 min inkubiert. Zum Stoppen des DNase I-Verdau wurden 1,5 µl Stop-Solution (15 mM EDTA) hinzugegeben, vermischt und kurz zentrifugiert. Anschließend wurden die Proben bei 70°C für 10 min inkubiert, danach sofort auf Eis gestellt und abzentrifugiert. Zu der RNA wurde ein 8,5 µl Mastermix (1x Ansatz) aus: 5 µl 5x Puffer, 2,5 µl 0,1M DTT, 1,25 µl dNTPs (10 µmol), 1,25 µl Random-Primer (250 ng/µl) und 0,56 µl SuperScript II (200 U/µl) zugefügt und vermischt. Die Reverse Transkriptase schrieb während einer Inkubation von 50 min bei 42°C die RNA in cDNA um. Für den anschließenden Reaktionsstopp wurden die Proben für 15 min bei 70°C inkubiert und anschließend zentrifugiert. Zur Aufbewahrung wurden die Proben bei -20°C eingefroren.

3.7.3 Quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion

Für die qRT-PCR wurde das ABI Prism 7000 Sequence Detection System (SDS) verwendet. Die Proben wurden in Duplikaten gemessen. Die Reaktionslösung für einen Ansatz setzte sich wie folgt zusammen (à 20 µl).

Der Mastermix (1x Ansatz):	10 µl Taq/Mastermix
	6 µl A. dest.
Der Primersondenmix (1x Ansatz):	0,18 µl forward Primer (100 µM)
	0,18 µl reverse Primer (100 µM)
	0,04 µl Sonde (100 µM)
	1,6 µl A. dest.
cDNA (1:10 verdünnt):	2 µl

Die Reaktion erfolgte nach folgendem Schema:

1. 95°C 10 min Aktivierung der Taq-Polymerase
2. 95°C 45 sec Denaturierung
3. 60°C 1 min Anlagerung und Elongation

Dabei durchliefen die Schritte 2 und 3 insgesamt 45 Zyklen.

Bei der Auswertung wurden die ΔC_T -Werte ermittelt. Diese berechneten sich aus:

$$\Delta C_T = C_T (\text{hk-Gen}) - C_T (\text{Zielgen})^2$$

$$\Delta C_T\text{- Mittelwerte (für jeden einzelnen Zeitpunkt)} = [\Delta C_T\text{-Werte (Maus 1)} + \Delta C_T\text{-Werte (Maus 2)} + \dots + \Delta C_T\text{-Werte (Maus x)}] / \text{Anzahl der Mäuse}$$

² Anmerkung: housekeeping(hk)-Gen = MLN51, Zielgen = CC10, CYP2F2, FoxJ1, CK5

3.8 Untersuchung der Zilienschlagfrequenz und des Partikeltransportes mittels Hochgeschwindigkeitsmikroskopie

Für die Messung der Zilienschlagfrequenz und des Partikeltransportes wurden die Mäuse mit Vehikel beziehungsweise Naphthalin behandelt und nach 4 d beziehungsweise 15 d getötet. Die Trachea wurde darauf (wie in 4. beschrieben) als Rohr isoliert. In einer Kulturschale wurde die Trachea längs des *Musculus trachealis* geöffnet, aufgeklappt und mit Minutien gespannt, so dass das Epithel nach oben zeigte. Anschließend wurde eventuell vorhandener Mukus durch zweimaliges Waschen mit HEPES-Ringerlösung entfernt. Zur Vermeidung der Austrocknung des Epithels wurde die Trachea mit 2 ml HEPES-Ringerlösung bedeckt. Die Kulturschale wurde auf 30°C (über den Delta T4 Dish Controller) erwärmt und die Temperatur konstant gehalten. Mit Hilfe einer Hochgeschwindigkeitskamera (SMX-150 M) wurden Bilder des Epithels durch ein Eintauchobjektiv (20- oder 40-fache Vergrößerung) über das Mikroskop (Axioskop 2 FS plus) zum Computer übertragen. Das Programm *Streampix* zeichnete die Filme auf, die anschließend gespeichert und ausgewertet werden.

3.8.1 Ermittlung der Zilienschlagfrequenz

Für die Messung der Zilienschlagfrequenz wurden Bilder mit 40-facher Vergrößerung (Eintauchobjektiv ACHROPLAN, 40x/0,80 w $\infty/0$) und einer Frequenz von 100 Hz bei einer Auflösung von 640x480 Pixel (1000 Bilder/Film) aufgenommen. Fünf zufällige Bereiche wurden je Trachea für die anschließende Analyse ausgewählt. Für die Auswertung der Zilienschlagfrequenz wurden fünf bis acht zilientragende Zellen pro Film ausgewählt und jeweils eine Stelle einer Zilie (8x8 Pixel) markiert (Abbildung 3). Innerhalb dieser Stelle ermittelte *Image-Pro Plus 6.1* die mittlere Helligkeit für jedes Bild. Über die Zeit veränderte sich durch den Zilienschlag die mittlere Helligkeit. Die Helligkeitsveränderungen über die Zeit wurden mittels Fourier-Transformation mit Hilfe der Software *Auto Signal v1.7* umgerechnet und so die Zilienschlagfrequenz der einzelnen Zellen bestimmt.

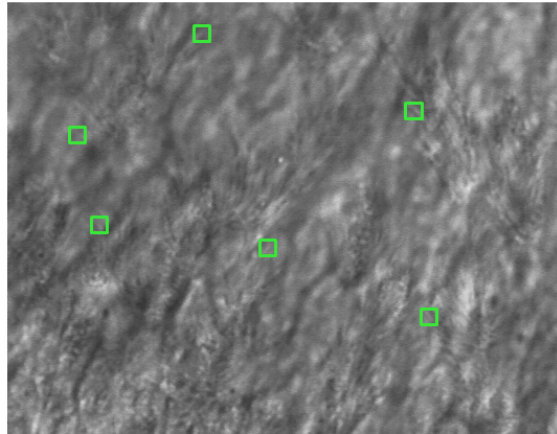


Abbildung 3 Trachealepithel mit zilientragenden Zellen. Für die Messung der Zilienschlagfrequenz wurden ausgewählte Bereiche mit grünen Kästchen markiert.

3.8.2 Ermittlung der Transportgeschwindigkeit

Nachdem die Aufnahmen für die Ermittlung der Zilienschlagfrequenz beendet wurden, wurden Untersuchungen für die Transportgeschwindigkeit durchgeführt. Hierfür wurden zunächst 20 μl Dynabeads (Polystyrenpartikel, Durchmesser von 4,5 μm) auf das Epithel der Trachea gegeben. Danach wurde an fünf zufällig ausgewählten Stellen des Epithels der Transport der Partikel in 20-facher Vergrößerung (Eintauchobjektiv von ACHROPLAN, 20x/0,50 w Ph2 $\infty/0$) und einer Frequenz von 12 Hz bei einer Auflösung von 1280x1024 Pixel (200 Bilder/Film) aufgenommen. Für die Ermittlung der Transportgeschwindigkeit wurde das Programm *Image-Pro Plus 6.1* genutzt. Das Programm verglich die Einzelbilder eines Films miteinander und zog den über die Zeit konstanten Teil der Bilder ab. Hierdurch wurde der Hintergrund in jedem Bild entfernt. Anschließend wurden die Partikel detektiert. Mit Hilfe eines im Programm vorhandenen automatisierten Tracking-Algorithmus wurden die Positionsveränderungen der Partikel von einem Bild zum anderen berechnet und ihre *Tracks* (Spuren) ermittelt. Für jeden Partikel wurde die zurückgelegte Entfernung von einem Bild zum nächsten gemessen. So erhielt man aus den Tracks die Geschwindigkeit. Anschließend wurde die Einzelgeschwindigkeit aus der Zeit und der gemessenen Entfernung berechnet. Aus den Einzelwerten wurde eine Durchschnittsgeschwindigkeit des Partikels errechnet und anschließend Durchschnittswerte eines Bereichs bzw. einer Trachea bestimmt. Mit Hilfe eines Maßstabs (STAGE Micrometer Diamond Ruled, 1 mm & 0,01 mm) wurde die Größe eines Pixels ermittelt und die relativen Geschwindigkeiten wurden in absolute Geschwindigkeiten umgerechnet.

3.9 Versuchsaufbau zur Untersuchung der Regeneration des Trachealepithels nach Intervention mit Lipopolysaccharid (LPS)

Für die Untersuchung, ob LPS die Regeneration des Trachealepithels beeinflusst, wurden nach Analyse des zeitlichen Ablaufs der epithelialen Regeneration zwei Zeitpunkte für die Intervention festgelegt: 48 h und 60 h nach Vehikel- (Öl) sowie Naphthalin-Gabe. Den Tieren wurden zunächst 200 µl (300 µg/g Mausgewicht) Naphthalin (in Maiskeimöl gelöst) oder 200 µl Maiskeimöl (Kontrollen) intraperitoneal injiziert. 48 h beziehungsweise 60 h danach wurde den Tieren LPS verabreicht. Dabei wurden die Tiere für die Applikation mit LPS zunächst mit einer geringen Dosis Isofluran durch Inhalation betäubt und anschließend 50 µl (5 µg/g Mausgewicht) LPS intranasal appliziert. 4 d nach Gabe von Vehikel oder Naphthalin wurden die Tiere mit einer Überdosis Isofluran getötet. Die Tracheen und Lungen wurden wie oben beschrieben entnommen und weiter verarbeitet. Für die Transportversuche an Tag 15 wurden lediglich die Tracheen entnommen. Nach Analyse von Zilienschlag und Transport wurden diese Tracheen mittels REM und angefertigten Semidünnschnitten untersucht (Abbildung 4).

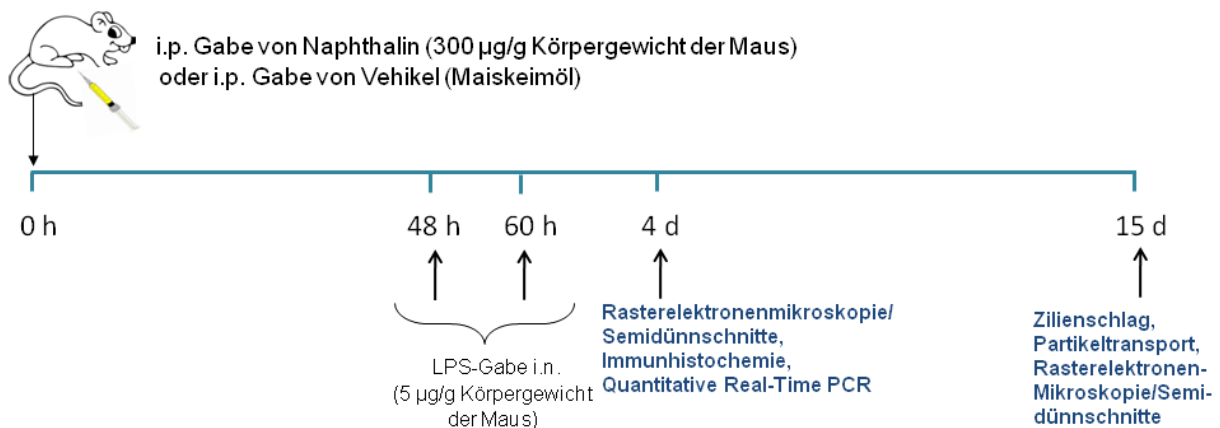


Abbildung 4 Schema der durchgeführten Analysen für die Intervention mit LPS 48 h bzw. 60 h nach Naphthalin-Gabe und die Untersuchung des Trachealepithels der Maus an Tag 4 und 15. An Tag 4 wurden Methoden wie Rasterelektronenmikroskopie sowie Semidünnschnitte, Immunhistochemie und quantitative Real-Time PCR verwendet. An Tag 15 wurden der Zilienschlag sowie der zilienvermittelte Transport ermittelt sowie rasterelektronenmikroskopische und Semidünnschnittuntersuchungen durchgeführt.

Tabelle 2 zeigt die Anzahl der Tiere, die in die LPS-Untersuchung eingegangen sind.

Tabelle 2 Übersicht zu den beanspruchten Tieren für die einzelnen Methoden und Zeitpunkte.

Methoden	Zeitpunkte	LPS Kontroll-Tiere	LPS Naphthalin-behandelte Tiere
REM/Semidünnschnitte	4 d; 15 d (Tiere aus den Transportversuchen)	6 (48 h), 6 (60 h)	6 (48 h), 6 (60 h)
Immunhistochemie	4 d	8 (48 h), 8 (60 h)	8 (48 h), 8 (60 h)
qRT-PCR	4 d	6 (48 h), 6 (60 h)	6 (48 h), 6 (60 h)
Transport	15 d	6 (48 h), 6 (60 h)	6 (48 h), 6 (60 h)

3.10 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung wurde mit dem Programm *GraphPad Prism 5* durchgeführt. Die Signifikanz der Proben wurde mit dem Mann-Whitney-Test ermittelt. Es wurden für die qRT-PCR, die Zilienschlagfrequenz und die Transportgeschwindigkeit jeweils die Mittelwerte mit dem dazugehörigen Standardfehler angegeben. Für die Auswertung der Zellproliferation wurden pro Trachea die Einzelwerte als prozentuale Zellproliferation mit dem Standardfehler angegeben. Die Signifikanzwerte wurden mit $p < 0,05$ (*) und $p < 0,01$ (**) angegeben.

4 Ergebnisse

4.1 *Ex vivo* Schädigung des Trachealepithels der Maus mittels Naphthalin

Die Wirkung von Naphthalin auf die Zellen des Trachealepithels wurde zunächst *ex vivo* untersucht (Abbildung 5). Im Epithel der Kontrolltrachea waren zilienträgende und nicht-zilienträgende Zellen unverändert im Epithelverband vorhanden (Abbildung 5A). Nach Inkubation mit Vehikel (20 μ l DMSO in 1 ml HEPES-Ringer Lösung) konnten keine Veränderungen im Trachealepithel festgestellt werden (Abbildung 5B).

Nach zwei- bis vierstündiger Inkubation mit 200 μ g Naphthalin (in 1 ml HEPES-Ringer Lösung) war eine deutliche Schädigung des Trachealepithels erkennbar (Abbildung 5C). Die nicht-zilienträgenden Zellen lösten sich nach Naphthalin-Gabe aus dem Epithelverband, so dass die Basalzellen frei lagen. Die verbleibenden zilienträgenden Zellen wurden dadurch im Trachealepithel zusammengedrängt (Abbildung 5D).

Epithel der Trachea der Maus *ex vivo*

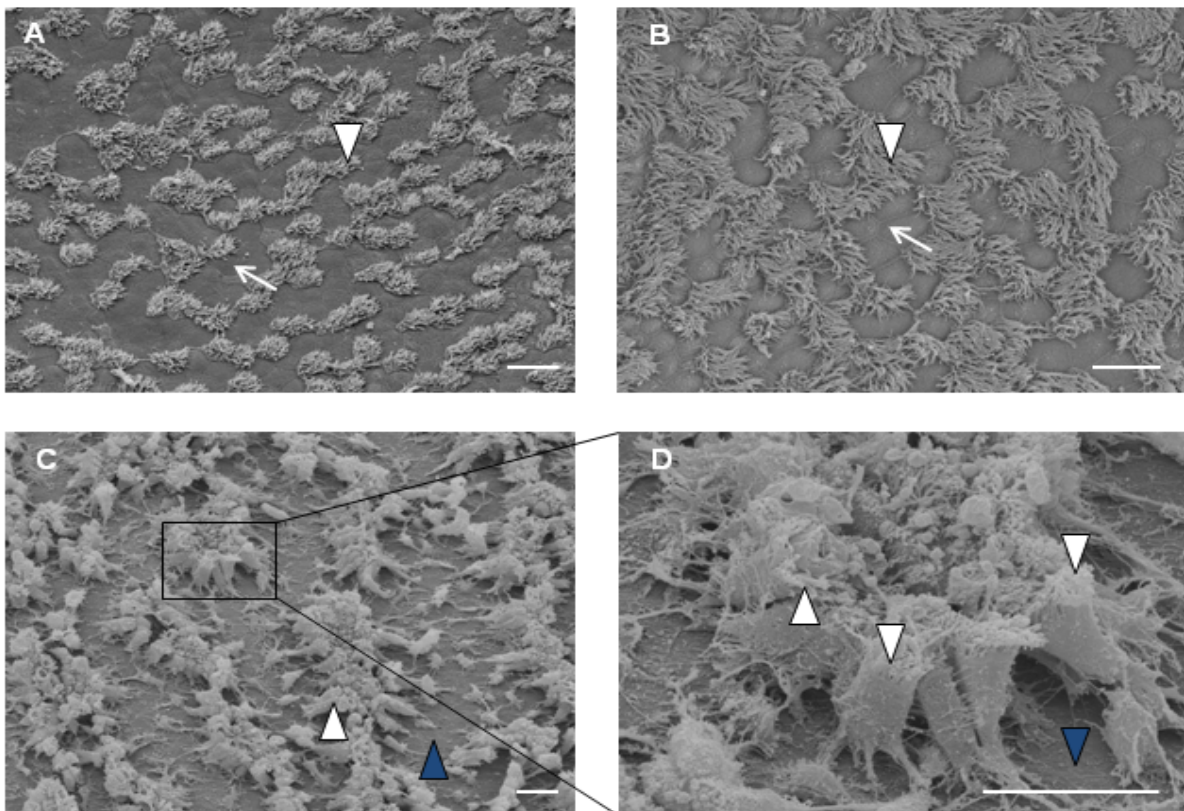


Abbildung 5 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des Trachealepithels der Maus vor und nach Naphthalin-Gabe *ex vivo*. A) Kontrolle: Unbehandeltes Epithel der Trachea. B) Kontrolle mit Vehikel (DMSO). C) Mit Naphthalin behandeltes Epithel. D) Vergrößerter Ausschnitt von Bild C. Nicht-zilienträgende Zellen (weißer Pfeil), zilienträgende Zellen (weiße Pfeilspitze), Basalzellen (blaue Pfeilspitze). 3 Experimente mit jeweils einer Maus pro Versuchsbedingung. Maßstab entspricht 20 μ m.

4.2 *In vivo* Schädigung des Atemwegsepithels mittels Naphthalin

4.2.1 Auswirkung von Naphthalin im murinen Tiermodell

Von insgesamt 245 (100%) mit Naphthalin behandelten Tieren haben 89,4% der Tiere (219 Tiere) die Behandlung überlebt (Abbildung 6A). Von den überlebenden Tieren wurden Untersuchungen mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM), Immunhistochemie (IHC) sowie quantitativer Real-Time PCR (qRT-PCR) durchgeführt.

Für die histologischen Untersuchungen mittels REM und IHC konnte eine genaue Aussage über die Wirkung von Naphthalin im Trachealepithel getroffen werden (Abbildung 6B). Bei diesen Tieren wurden auch die Lungen als Kontrollen untersucht und als Maßstab für eine Reaktion auf Naphthalin genutzt. Wurden in der Lunge Schädigungen durch die Naphthalin-Behandlung festgestellt, lösten sich also nicht-zilientragende Zellen vom Epithel und platteten sich zilientragende Zellen auf der Basalmembran ab, so wurden diese Tiere als Responder eingestuft und gingen in die Auswertung ein. Für die REM- und IHC-Versuche wurden 168 Tiere mit Naphthalin behandelt, davon sind 16 Tiere (9,5%) verstorben und 27 Tiere (16,1%) zeigten in der Lunge keine Reaktion auf Naphthalin. Es haben 59 Tiere (von insgesamt 74 überlebenden Tieren; 79,7%) in den REM-Versuchen und 66 Tiere (von insgesamt 78 überlebenden Tieren; 84,6%) in den IHC-Versuchen eine Reaktion auf Naphthalin gezeigt.

Von den 56 für die qRT-PCR-Versuche behandelten Tiere überlebten 46 Tiere. Da bei diesen Tieren keine Lungen als interne Kontrolle vorlagen, wurden alle überlebenden Tiere (46 Tiere) in die Auswertung einbezogen.

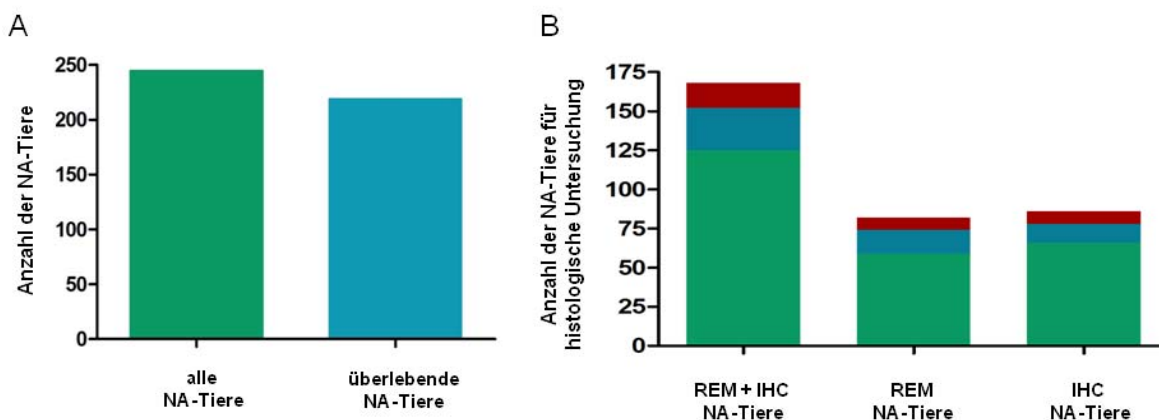


Abbildung 6 Graphische Übersicht über die in die Versuche eingegangenen Tiere. A) Anzahl der Tiere, die Naphthalin erhalten haben. Dargestellt werden alle mit Naphthalin-behandelten Tiere (grün, 245 Tiere) sowie die Tiere, die nach Naphthalin-Gabe überlebt haben (blau, 219 Tiere). B) Anzahl der Naphthalin-behandelten Tiere für die histologische Untersuchung. Tiere, die auf Naphthalin angesprochen haben (grün, REM = 59 Tiere; IHC = 66 Tiere), Tiere, die nicht auf Naphthalin angesprochen haben (blau, REM = 15 Tiere; IHC = 12 Tiere) und verstorbene Tiere (rot, jeweils 8 Tiere).

Von den mit Naphthalin behandelten, überlebenden Tieren (219 Tiere) wurden insgesamt 87,7% der Tiere (59 Tiere REM, 66 Tiere IHC und 46 Tiere qRT-PCR sowie 21 Tiere Partikeltransport) in die Auswertung einbezogen.

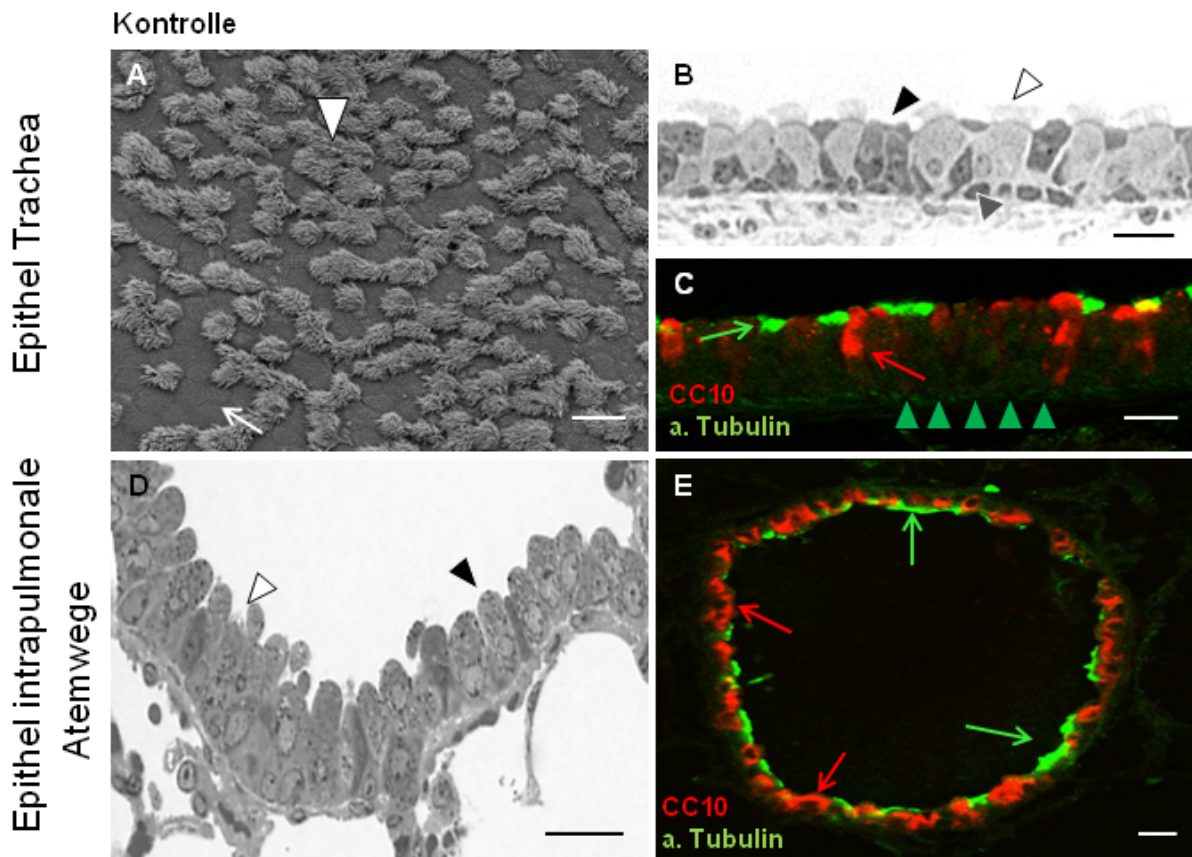
4.2.2 *In vivo* Regeneration des Atemwegsepithels der Maus nach Naphthalin-Gabe

Die *ex vivo*-Daten zeigten, dass die zilientragenden Zellen auf der Basalmembran verblieben und die nicht-zilientragenden Zellen sich nach direkter Naphthalin-Gabe vom Trachealepithel ablösten. Im Folgenden wurde untersucht, wie das Trachealepithel der Maus *in vivo* auf Naphthalin reagiert.

Kontrolle: gesundes Epithel der Maus nach Vehikel-Gabe

In der Kontrollbehandlung mit Maiskeimöl waren normale zilientragende und nicht-zilientragende Zellen im Trachealepithel vorhanden (Abbildung 7A-C). Die nicht-zilientragenden Zellen zeigten dunkles Zytoplasma (Abbildung 7B). Dagegen besaßen die zilientragenden Zellen helles Zytoplasma und Zilien, die ins Lumen zeigten (Abbildung 7B). Die Basalzellen waren mit der Basalmembran verbunden und befanden sich unter den nicht-zilientragenden und zilientragenden Zellen (Abbildung 7B). Die nicht-zilientragenden Zellen wurden in der IHC durch CC10, die Zilien der zilientragenden Zellen durch acetyliertes Tubulin angefärbt (Abbildung 7C).

Im Epithel der intrapulmonalen Atemwege besaßen die nicht-zilientragenden Zellen dunkleres Zytoplasma und ragten weiter ins Lumen (Abbildung 7D). Die zilientragenden Zellen zeigten helleres Zytoplasma und waren kleiner als die nicht-zilientragenden Zellen (Abbildung 7D). Ein Teil der nicht-zilientragenden Zellen war in der IHC CC10-immunreaktiv und die Zilien der zilientragenden Zellen waren durch acetyliertes Tubulin markiert (Abbildung 7E). Im Gegensatz zu dem Trachealepithel befanden sich in den intrapulmonalen Atemwegen keine Basalzellen auf der Basalmembran.



Epithel 12 h nach Naphthalin-Gabe: erste nicht-zilientragende Zellen lösten sich vom Epithel

12 h nach Naphthalin-Gabe (Abbildung 8) lösten sich einige nicht-zilientragende Zellen aus dem Epithel der Trachea. Herausgelöste, tote Zellen lagen auf dem Epithel (Abbildung 8A). Abgestorbene nicht-zilientragende Zellen befanden sich im Lumen (Abbildung 8B und 8C). Die Basalzellen verblieben auf der Basalmembran (Abbildung 8B).

In den intrapulmonalen Atemwegen lösten sich nur sekretorische Zellen ab und gelangten ins Lumen (Abbildung 8D sowie 8E). Die zilientragenden Zellen waren im Semidünnschnitt unverändert (Abbildung 8D). Sie wurden durch die Markierung der Zilien mit acetyliertem Tubulin nachgewiesen und befanden sich aufgrund der Befüllung der Lunge mit PBS-Tissue Freezing Medium unterhalb abgelöster nicht-zilientragender Zellen (Abbildung 8E).

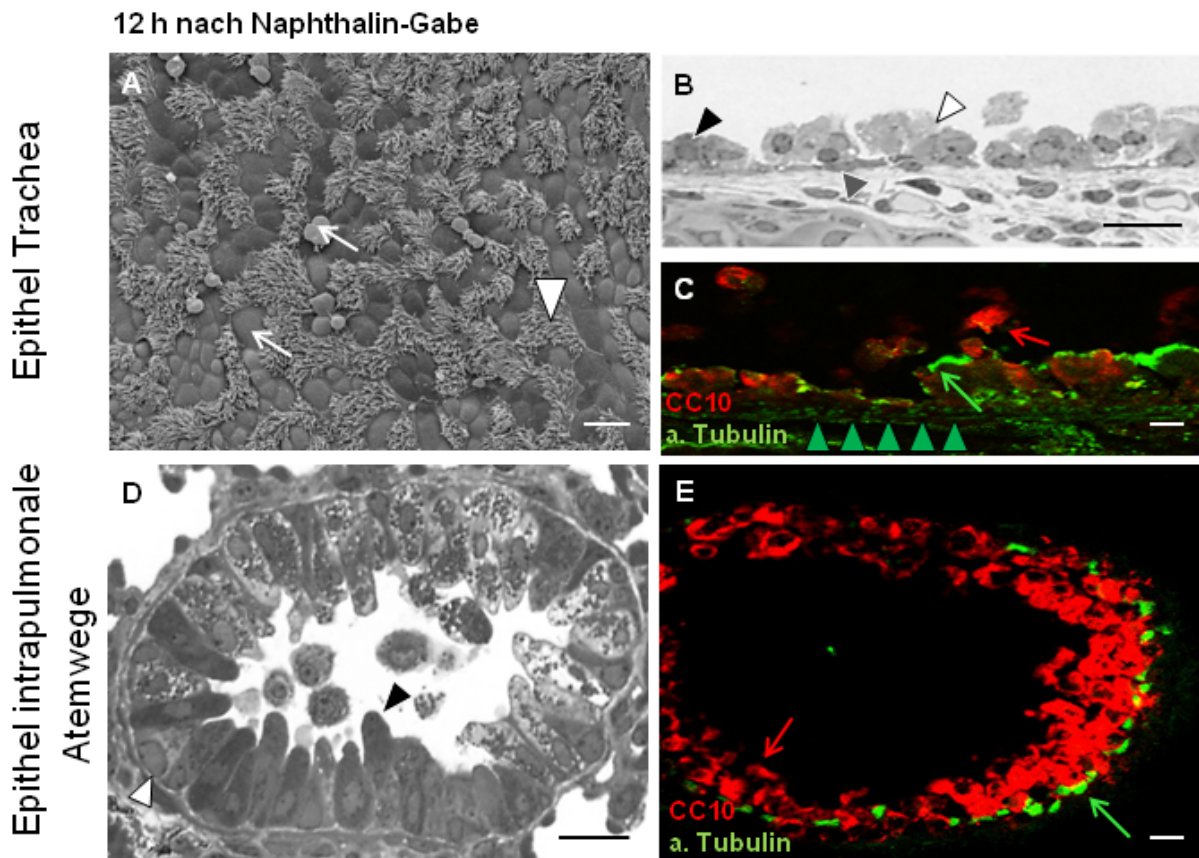


Abbildung 8 Atemwegsepithel der Maus 12 h nach Naphthalin-Gabe.

A-C) Epithel der Trachea. A) REM-Aufnahme: erste herausgelöste nicht-zilientragende Zellen (weißer Pfeil) auf dem Epithel der Trachea. Nicht-zilientragende Zellen (weißer Pfeil), zilientragende Zellen (weiße Pfeilspitze). B) Semidünnschnitt des Epithels: herausgelöste nicht-zilientragende Zellen (schwarze Pfeilspitze) und herausgelöste zilientragende Zellen (weiße Pfeilspitze). Basalzellen (graue Pfeilspitze) befinden sich auf Basalmembran. C) Immunfluoreszenzmarkierung vom Epithel der Trachea: abgelöste sekretorische Zellen (rot sowie roter Pfeil, Antikörper gegen CC10) und Zilien der zilientragenden Zellen (grün sowie grüner Pfeil, Antikörper gegen acetyliertes Tubulin (a. Tubulin)). Basalmembran (grüne Pfeilspitzen), grün fluoreszierende Fasern über grünen Pfeilspitzen aufgrund von Autofluoreszenz. D+E) Epithel der intrapulmonalen Atemwege. D) Semidünnschnitt der Epithelzellen der Lunge. Nicht-zilientragende Zellen (schwarze Pfeilspitze) und zilientragende Zellen (weiße Pfeilspitze). E) Immunfluoreszenzmarkierung: vom Epithel abgelöste sekretorische Zellen (rot sowie roter Pfeil, Antikörper gegen CC10) und aufgrund der Lungenbefüllung mit PBS-Tissue Freezing Medium wurden Zilien zilientragender Zellen (grün sowie grüner Pfeil, Antikörper gegen acetyliertes Tubulin (a. Tubulin)) unterhalb nicht-zilientragender Zellen lokalisiert. REM/Semidünnschnitt: 3 Experimente mit jeweils 2 Mäusen (n=6). IHC: 3 Experimente mit jeweils 2 Mäusen (n=6, 5 Tiere hatten auf Naphthalin angesprochen). Maßstab entspricht 20 µm.

Epithel 24 h nach Naphthalin-Gabe: nicht-zilientragende und zilientragende Zellen lösten sich vom Epithel

24 h nach Naphthalin-Gabe (Abbildung 9) war ein Teil der nicht-zilientragenden und zilientragenden Zellen von der Basalmembran abgelöst (Abbildung 9A). Auch im Semidünnschnitt waren nicht-zilientragende und zilientragende Zellen von der Basalmembran abgelöst zu sehen (Abbildung 9B). Abgelöste nicht-zilientragende (CC10-positive Zellen, 9C) und zilientragende Zellen (acetyliertes Tubulin-positive Zellen, 9C) befanden sich im Lumen (Abbildung 9B und 9C). Die Basalzellen verblieben unverändert auf der Basalmembran (Abbildung 9B).

In den intrapulmonalen Atemwegen blieben die zilientragenden Zellen breit mit der Basalmembran verbunden. (Abbildung 9D). Obwohl die zilientragenden Zellen nur teilweise erkennbare Zilien aufwiesen, konnten die Zellen mit einem Antikörper gegen acetyliertes Tubulin angefärbt werden (Abbildung 9E). Die sekretorischen Zellen (CC10-positiv) befanden sich vakuolisiert und abgelöst im Lumen (Abbildung 9D und 9E).

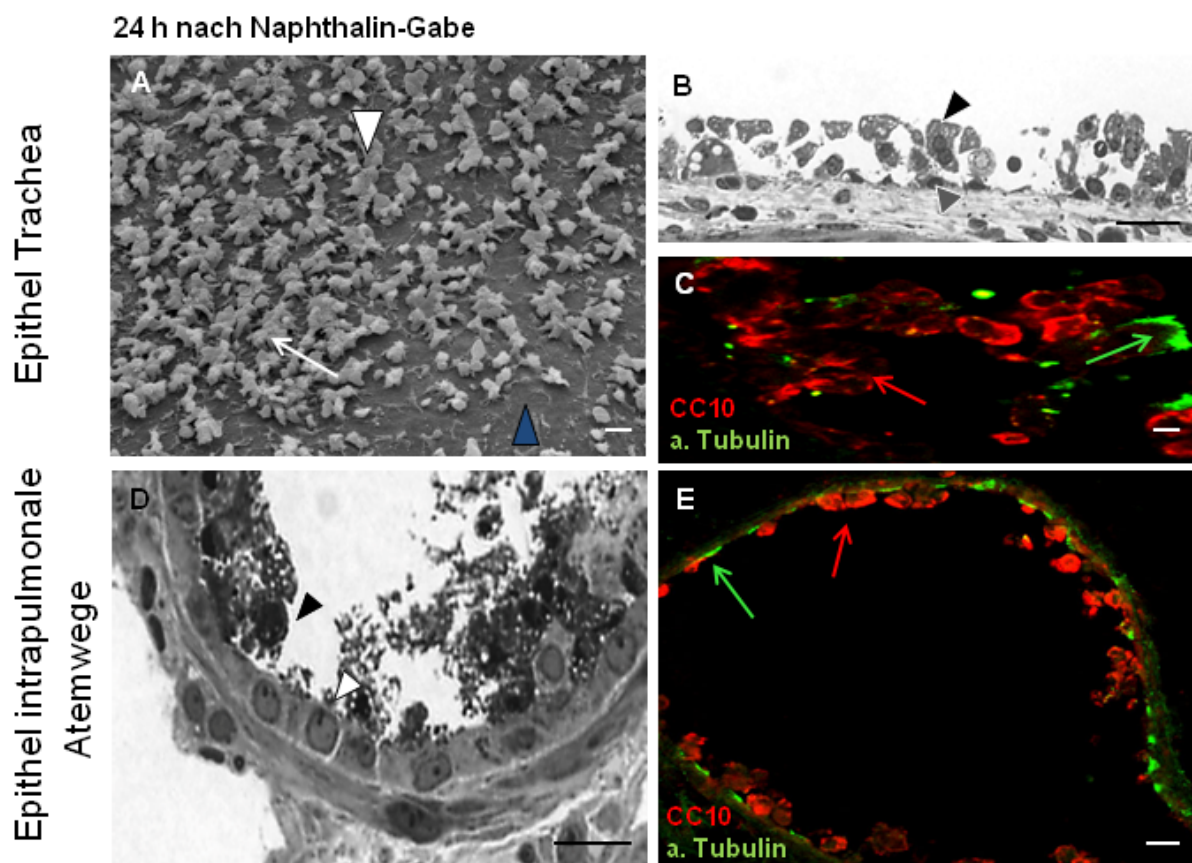


Abbildung 9 Atemwegsepithel der Maus 24 h nach Naphthalin-Gabe.

A-C) Epithel der Trachea. A) REM-Aufnahme: Aufsicht auf abgelöste nicht-zilientragende (weißer Pfeil) und zilientragende Epithelzellen (weiße Pfeilspitze) der Trachea der Maus. Basalzellen (blaue Pfeilspitze) verbleiben auf der Basalmembran. B) Semidünnschnitt des Epithels: Vom Epithel abgelöste nicht-zilientragende Zellen (schwarze Pfeilspitze). Basalzellen (graue Pfeilspitze). C) Immunfluoreszenzmarkierung: vakuolisierte sekretorische Zellen (rot sowie roter Pfeil, Antikörper gegen CC10) und Zilien zilientragender Zellen (grün sowie grüner Pfeil, Antikörper gegen acetyliertes Tubulin (a. Tubulin)). D+E) Epithel der intrapulmonalen Atemwege. D) Semidünnschnitt des einschichtigen Epithels der Lunge. Nicht-zilientragende Zellen (schwarze

Pfeilspitze), zilientragende Zellen (weiße Pfeilspitze). E) Immunfluoreszenzmarkierung vom Epithel: vakuolisierte und abgelöste sekretorische Zellen befinden sich im Lumen (rot sowie roter Pfeil, Antikörper gegen CC10) und Zilien zilientragender Zellen nahe der Basalmembran lokalisiert (grün sowie grüner Pfeil, Antikörper gegen acetyliertes Tubulin (α-Tubulin)). REM/Semidünnschnitt: 3 Experimente mit jeweils 2 Mäusen (n=6). IHC: 3 Experimente mit jeweils 2 Mäusen (n=6, 5 Tiere hatten auf Naphthalin angesprochen). Maßstab entspricht 20 µm.

Epithel 48 h nach Naphthalin-Gabe: nur Basalzellen verblieben auf der Basalmembran

48 h nach Naphthalin-Gabe (Abbildung 10) verblieben nur noch die Basalzellen in der Trachea. Die teils pyramidenförmigen, teils flachen Basalzellen bedeckten die Basalmembran vollständig (Abbildung 10A und 10B). Nicht-zilientragende Zellen befanden sich abgelöst im Lumen der Trachea (Abbildung 10C).

Im Vergleich zu 24 h nach Naphthalin-Gabe blieb das Epithel der intrapulmonalen Atemwege unverändert (Abbildung 10D). Die sekretorischen Zellen befanden sich im Lumen (Abbildung 10D und 10E). Zilien der zilientragenden Zellen waren in den unbefüllten Lungen der Semidünnschnitte morphologisch nicht zu erkennen (Abbildung 10D), jedoch konnte acetyliertes Tubulin immunhistochemisch in Zellen, die auf der Basalmembran auflagern, nachgewiesen werden (Abbildung 10E).

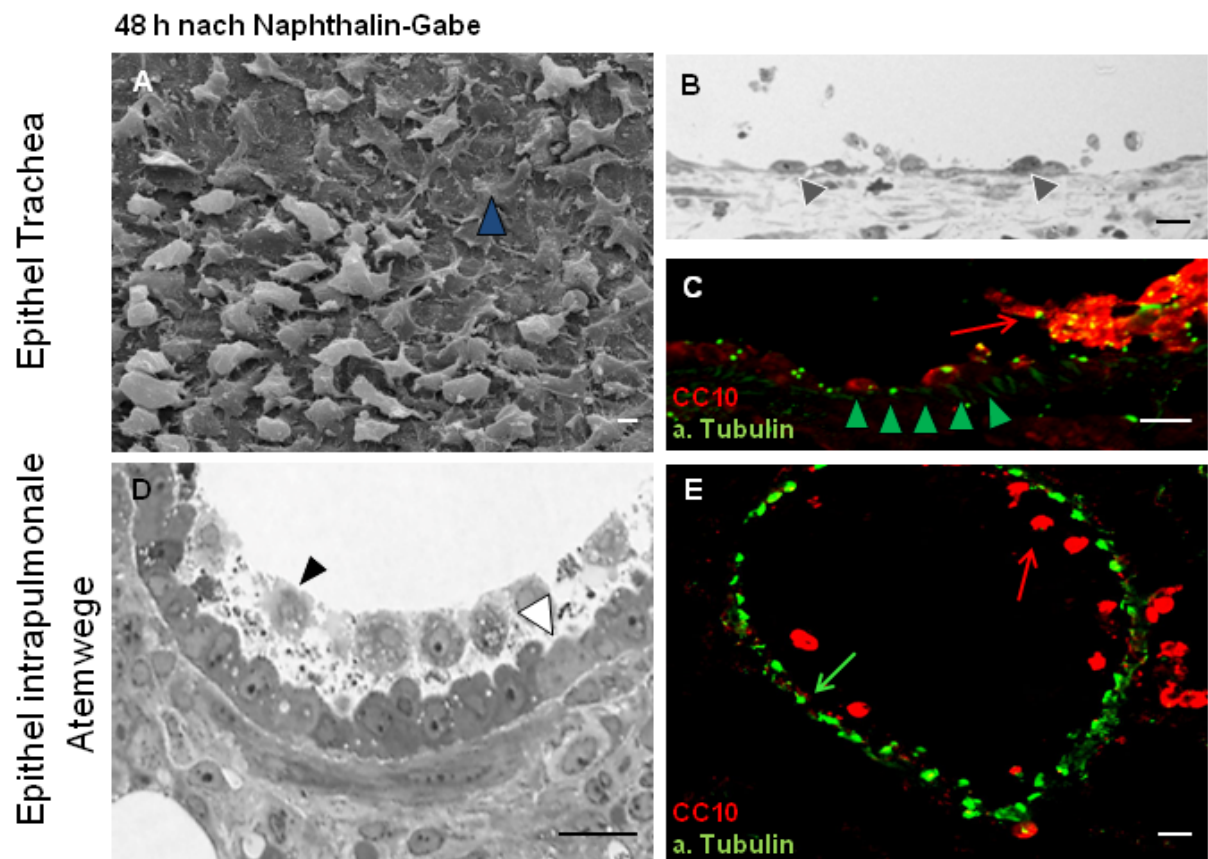


Abbildung 10 Atemwegsepithel der Maus 48 h nach Naphthalin-Gabe.

A-C) Epithel der Trachea. A) REM-Aufnahme: Aufsicht auf Basalzellen (blaue Pfeilspitze) in der Trachea der Maus. B) Semidünnschnitt des Epithels: pyramidenförmig Basalzellen (graue Pfeilspitze). C) Immunfluoreszenzmarkierung: vakuolisierte sekretorische Zellen (rot sowie roter Pfeil, Antikörper gegen CC10) im Lumen. Basalmembran (grüne Pfeilspitzen). D+E) Epithel der intrapulmonalen Atemwege. D) Semidünnschnitt der Epithelzellen der Lunge mit abgelösten nicht-zilientragenden Zellen (schwarze Pfeilspitze) und zilientragenden Zellen (weiße Pfeilspitze) auf der Basalmembran. E) Immunfluoreszenzmarkierung: vakuolisierte und vom Epithel abgelöste sekretorische Zellen im Lumen (rot sowie roter Pfeil, Antikörper gegen CC10) und Zilien abgeplatteter zilientragender Zellen (grün sowie grüner Pfeil, Antikörper gegen acetyliertes Tubulin (a. Tubulin)). 3 Experimente mit jeweils 2 Mäusen (REM/Semidünnschnitt: n=6, 4 Tiere hatten auf Naphthalin angesprochen; IHC: n=6, 5 Tiere hatten auf Naphthalin angesprochen). Maßstab entspricht 20 μm .

Epithel 60 h nach Naphthalin-Gabe: morphologische Veränderung der Basalzellen

60 h nach Naphthalin-Gabe (Abbildung 11) befanden sich in den REM-Untersuchungen noch Reste nicht-zilientragender und zilientragender Zellen abgelöst auf der Trachea (Abbildung 11A). In den untersuchten Tracheen von zwei Tieren waren bereits erste differenzierte Zellen vorhanden (Abbildung 11A). Die Basalzellen verblieben auf der Basalmembran (Abbildung 11B), ihre Morphologie wechselte von pyramidenförmig zu oval/rundlich. Dieses wurde in der Immunhistochemie (siehe Abbildung 21) durch die Markierung mit dem Antikörper anti-p75 ebenfalls beobachtet.

In den intrapulmonalen Atemwegen bedeckten die zilientragenden Zellen die Basalmembran, die Zilien waren jedoch morphologisch nicht erkennbar (Abbildung 11D). In der Immunhistochemie wurde acetyliertes Tubulin in Zellen nachgewiesen, die flach auf der Basalmembran aufsaßen (Abbildung 11E). Reste sekretorischer Zellen waren noch im Lumen nachweisbar (Abbildung 11D sowie 11E).

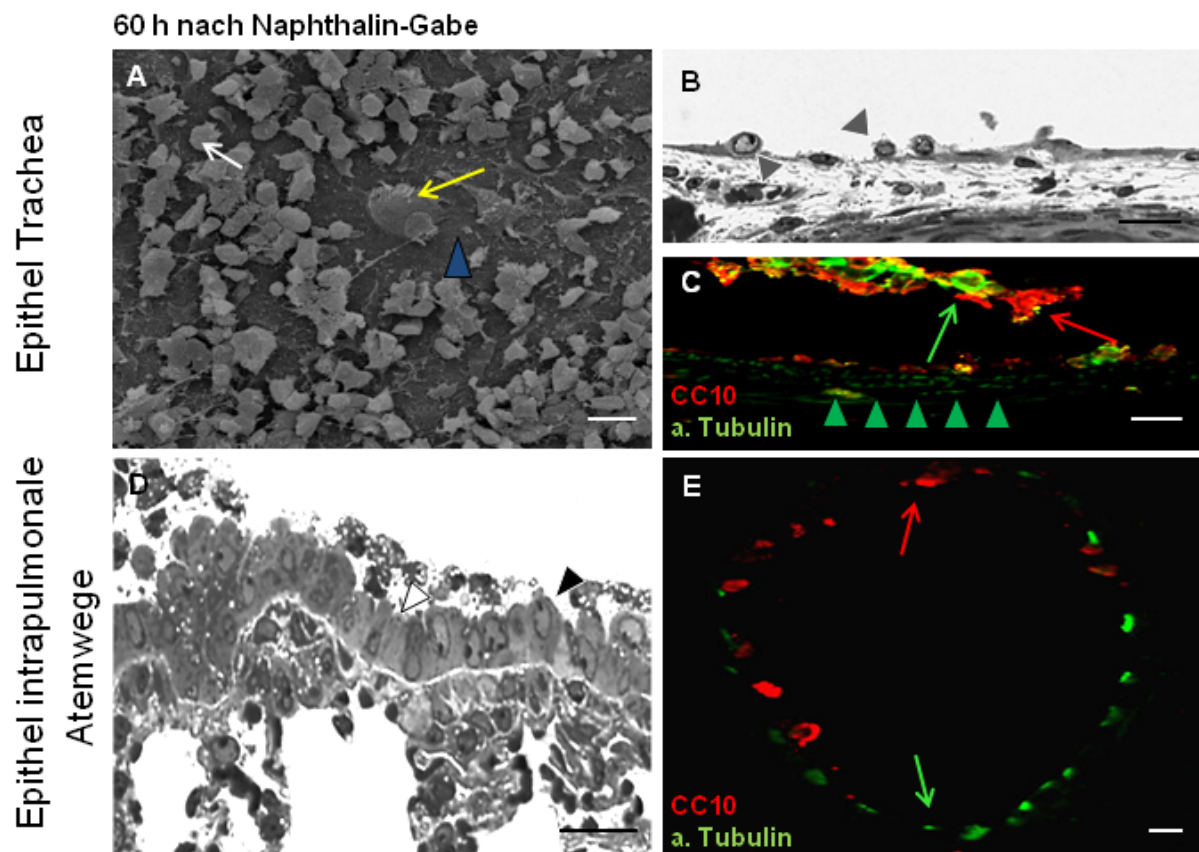


Abbildung 11 Atemwegsepithel der Maus 60 h nach Naphthalin-Gabe.

A-C) Epithel der Trachea. A) REM-Aufnahme: Aufsicht auf Basalzellen (blaue Pfeilspitze), nicht-zilientragenden Zellen (weißer Pfeil) sowie eine einzelne zilientragende Zelle (gelber Pfeil) auf der Basalmembran der Trachea der Maus. B) Semidünnschnitt des Epithels: runde Basalzellen (graue Pfeilspitze). C) Immunfluoreszenzmarkierung: abgelöste sekretorische Zellen (rot sowie roter Pfeil, Antikörper gegen CC10) sowie zilientragende Zellen (grün sowie grüner Pfeil, Antikörper gegen acetyliertes Tubulin (a. Tubulin)) im Lumen. Basalmembran (grüne Pfeilspitzen), grün fluoreszierende Fasern über grünen Pfeilspitzen aufgrund von Autofluoreszenz. D+E) Epithel der intrapulmonalen Atemwege. D) Semidünnschnitt des Epithels der Lunge. Nicht-zilientragende

Zellen (schwarze Pfeilspitze) und zilientragende Zellen (weiße Pfeilspitze). E) Immunfluoreszenzmarkierung: abgelöste sekretorische Zellen (rot sowie roter Pfeil, Antikörper gegen CC10) im Lumen und Zilien zilientragender Zellen (grün sowie grüner Pfeil, Antikörper gegen acetyliertes Tubulin (a. Tubulin)) nahe der Basalmembran lokalisiert. REM/semidünnschnitt: 5 Experimente mit jeweils 2 Mäusen (n=10, 5 Tiere hatten auf Naphthalin angesprochen). IHC: 5 Experimente mit jeweils 2 Mäusen (n=10, 6 Tiere hatten auf Naphthalin angesprochen). Maßstab entspricht 20 µm.

Epithel 3 d (72 h) nach Naphthalin-Gabe: neuer Epithelverband mit kurzen Zilien

3 d (72 h) nach Naphthalin-Gabe (Abbildung 12) war eine erste Differenzierung der Zellen im Trachealepithel der Maus zu beobachten. Erste nicht-zilientragende Zellen sowie Zellen mit kurzen Zilien waren erkennbar (Abbildung 12A). Mehrere Reihen von Zellen sowie erste zilientragende Zellen mit Zilien waren in den Semidünnschnitten vorhanden (Abbildung 12B). Die nicht-zilientragenden Zellen konnten mit dem anti-CC10 Antikörper immunhistochemisch nicht markiert werden (Abbildung 12C). Erste Zilien der zilientragenden Zellen waren acetyliertes Tubulin-positiv (Abbildung 12C).

In den intrapulmonalen Atemwegen waren einige nicht-zilientragende Zellen vorhanden (Abbildung 12D). Im Semidünnschnitt konnten zudem noch Reste abgestorbener Zellen im Lumen gefunden werden (Abbildung 12D). Zilien waren auf den zilientragenden Zellen in den Semidünnschnitten morphologisch nicht sichtbar (Abbildung 12D), jedoch konnte immunhistochemisch acetyliertes Tubulin in Zellen nachgewiesen werden, die flach auf der Basalmembran aufsaßen (Abbildung 12E).

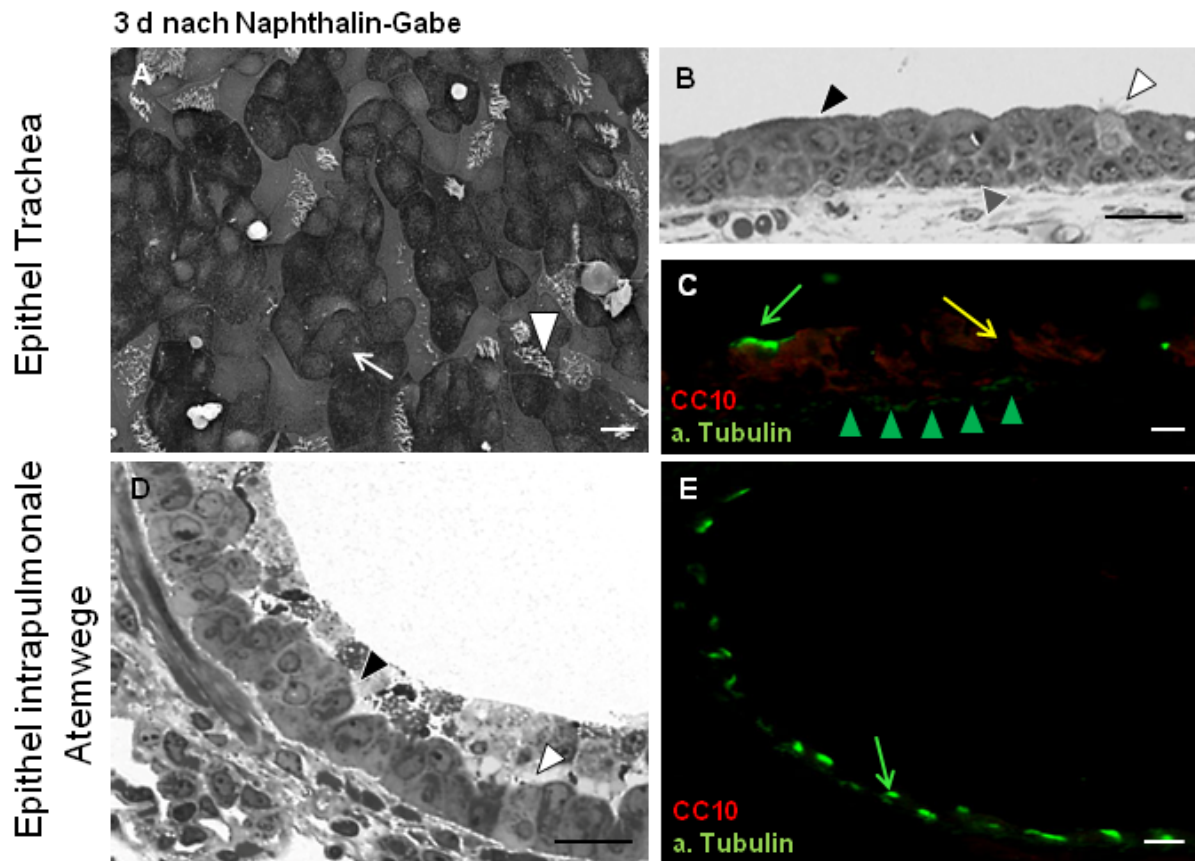


Abbildung 12 Atemwegsepithel der Maus 3 d (72 h) nach Naphthalin-Gabe.

A-C) Epithel der Trachea. A) REM-Aufnahme: Aufsicht auf einen ersten Verband von Epithelzellen (weißer Pfeil) mit kurzen Zilien (weiße Pfeilspitze) in der Trachea der Maus. B) Semidünnschnitt des Epithels: nicht-zilientragende Zellen (schwarze Pfeilspitze) und zilientragende Zellen (weiße Pfeilspitze) sowie Basalzellen (graue Pfeilspitze). C) Immunfluoreszenzmarkierung: zilientragende Zellen (grün sowie grüner Pfeil, Antikörper gegen acetyliertes Tubulin (a. Tubulin)), ungefärbte Zellen (gelber Pfeil), Basalmembran (grüne Pfeilspitzen). D+E) Epithel der intrapulmonalen Atemwege. D) Semidünnschnitt des Epithels der Lunge. Nicht-zilientragende Zellen (schwarze Pfeilspitze), zilientragende Zellen (weiße Pfeilspitze). E) Immunfluoreszenzmarkierung: Zilien zilientragender Zellen (grün sowie grüner Pfeil, Antikörper gegen acetyliertes Tubulin (a. Tubulin)) nahe der Basalmembran lokalisiert. REM/Semidünnschnitt: 5 Experimente mit jeweils 2 Mäusen (n=10, 8 Tiere hatten auf Naphthalin angesprochen). IHC: 5 Experimente mit jeweils 2 Mäusen (n=10, 7 Tiere hatten auf Naphthalin angesprochen). Maßstab entspricht 20 µm.

Epithel 4 d nach Naphthalin-Gabe: differenzierte Zellen mit kurzen Zilien

4 d nach Naphthalin-Gabe (Abbildung 13) differenzierten sich die Epithelzellen der Trachea der Maus weiter (Abbildung 13A). Die zilientragenden Zellen waren nun deutlich erkennbar und besaßen unterschiedlich lange Zilien (Abbildung 13A sowie 13B). Die rundlich erscheinenden Basalzellen saßen dicht nebeneinander unter den weiter differenzierten Zellen auf der Basalmembran (Abbildung 13B). Dies konnte ebenfalls in der Immunhistochemie (siehe Abbildung 21) durch Markierung der Basalzellen mit dem Antikörper gegen p75 beobachtet werden. Aufgrund der runden Zellmorphologie (Abbildung 13B) ist es möglich, dass die nicht-zilientragenden Zellen noch nicht differenziert sind. Die Zellen erschienen nicht wie üblich oval und reichten auch nicht von der Basalmembran bis ins Lumen der Trachea. Durch Fehlen des Proteins CC10 war es immunhistochemisch nicht möglich, die nicht-zilientragenden Zellen nachzuweisen (Abbildung 13C).

In den intrapulmonalen Atemwegen war ein Epithel mit unterschiedlichen Zelltypen vorhanden. Nicht-zilientragende und zilientragende Zellen waren deutlich erkennbar (Abbildung 13D). Trotz weiterer Differenzierung der Epithelzellen konnten nicht-zilientragende Zellen immunhistochemisch nicht mit einem Antikörper gegen CC10 angefärbt werden (Abbildung 13E). Lediglich die Zilien der zilientragenden Zellen waren sichtbar (Abbildung 13E).

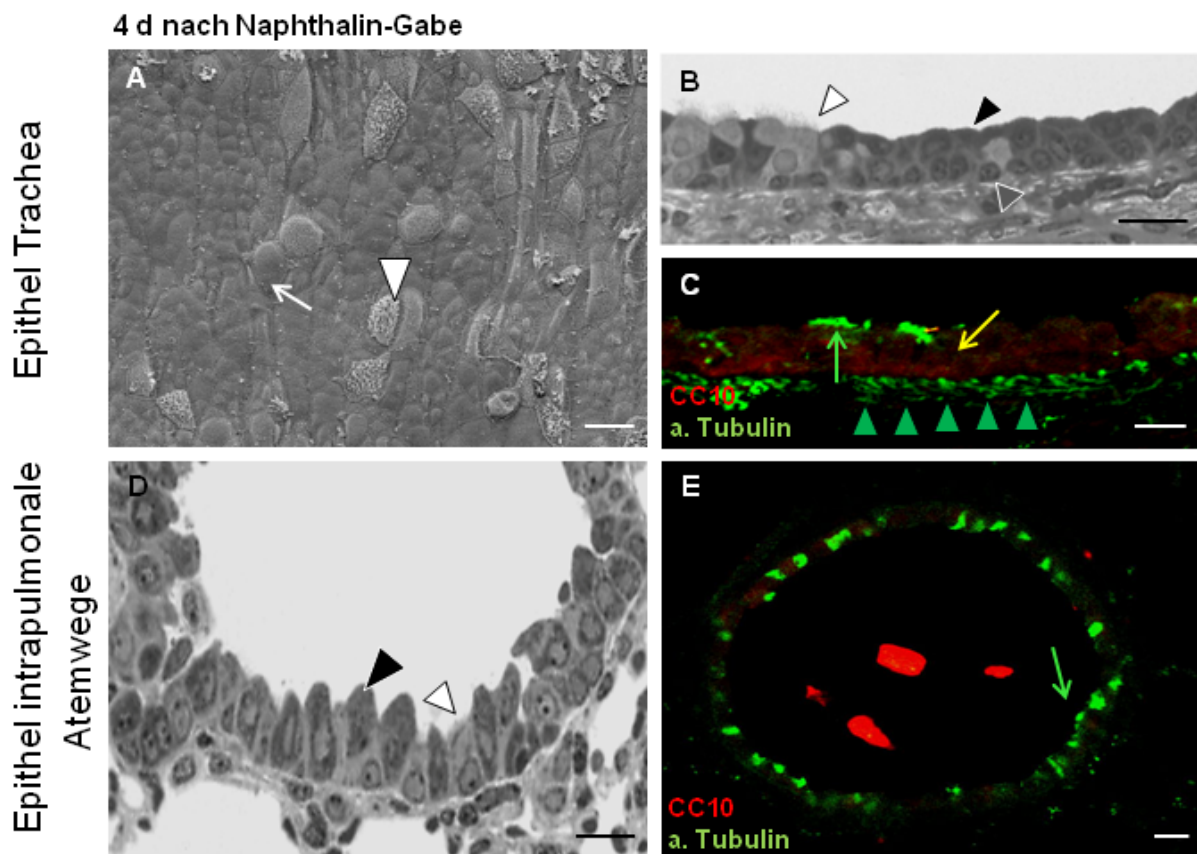


Abbildung 13 Atemwegsepithel der Maus 4 d nach Naphthalin-Gabe.

A-C) Epithel der Trachea. A) REM-Aufnahme: Weiter differenzierte Epithelzellen (weißer Pfeil) und unterschiedlich lange Zilien (weiße Pfeilspitze) in der Trachea der Maus. B) Semidünnschnitt des Epithels: nicht-zilientragende Zellen (schwarze Pfeilspitze) und zilientragende Zellen (weiße Pfeilspitze) sowie Basalzellen (graue Pfeilspitze). C) Immunfluoreszenzmarkierung vom Trachealepithel: Zilien der zilientragenden Zellen (grün sowie grüner Pfeil, Antikörper gegen acetyliertes Tubulin (a. Tubulin)), ungefärbte Zellen (gelber Pfeil), Basalmembran (grüne Pfeilspitzen), grün fluoreszierende Fasern über grünen Pfeilspitzen aufgrund von Autofluoreszenz. D+E) Epithel der intrapulmonalen Atemwege. D) Semidünnschnitt des Epithels der Lunge mit nicht-zilientragenden Zellen (schwarze Pfeilspitze) und zilientragenden Zellen (weiße Pfeilspitze). E) Immunfluoreszenzmarkierung: Zilien zilientragender Zellen (grün sowie grüner Pfeil, Antikörper gegen acetyliertes Tubulin (a. Tubulin)). REM/Semidünnschnitt: REM/Semidünnschnitt: 3 Experimente mit jeweils 2 Mäusen (n=6, 4 Tiere hatten auf Naphthalin angesprochen). IHC: 4 Experimente mit jeweils 2 Mäusen (n=8, 7 Tiere hatten auf Naphthalin angesprochen). Maßstab entspricht 20 µm.

Epithel 5 d nach Naphthalin-Gabe: nicht-zilientragende und zilientragende Zellen nachweisbar

5 d nach Naphthalin-Gabe (Abbildung 14) hatte sich der Epithelverband der Trachea soweit regeneriert, dass die zilientragenden Zellen einheitlich lange, jedoch nur wenige Zilien aufwiesen (Abbildung 14A, 14B sowie 14C). Die Zilienlänge entsprach jedoch noch keiner normalen Länge der Zilien zilientragender Zellen im gesunden Epithel. Die sekretorischen Zellen wiesen eine einheitliche Größe auf (Abbildung 14B). Pyramidenförmige Basalzellen waren auf der Basalmembran zwischen den zilientragenden und nicht-zilientragenden Zellen zu finden (Abbildung 14B). Erstmals waren CC10-immunreaktive nicht-zilientragende Zellen nachweisbar (Abbildung 14C). Die Zilien der zilientragenden Zellen waren acetyliertes Tubulin-positiv gefärbt (Abbildung 14C).

In den intrapulmonalen Atemwegen waren die nicht-zilientragenden und die zilientragenden Zellen wieder vorhanden (Abbildung 14D). Neben den Zilien der zilientragenden Zellen (acetyliertes Tubulin-positiv) konnten auch erstmals CC10-immunreaktive nicht-zilientragende Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 14E).

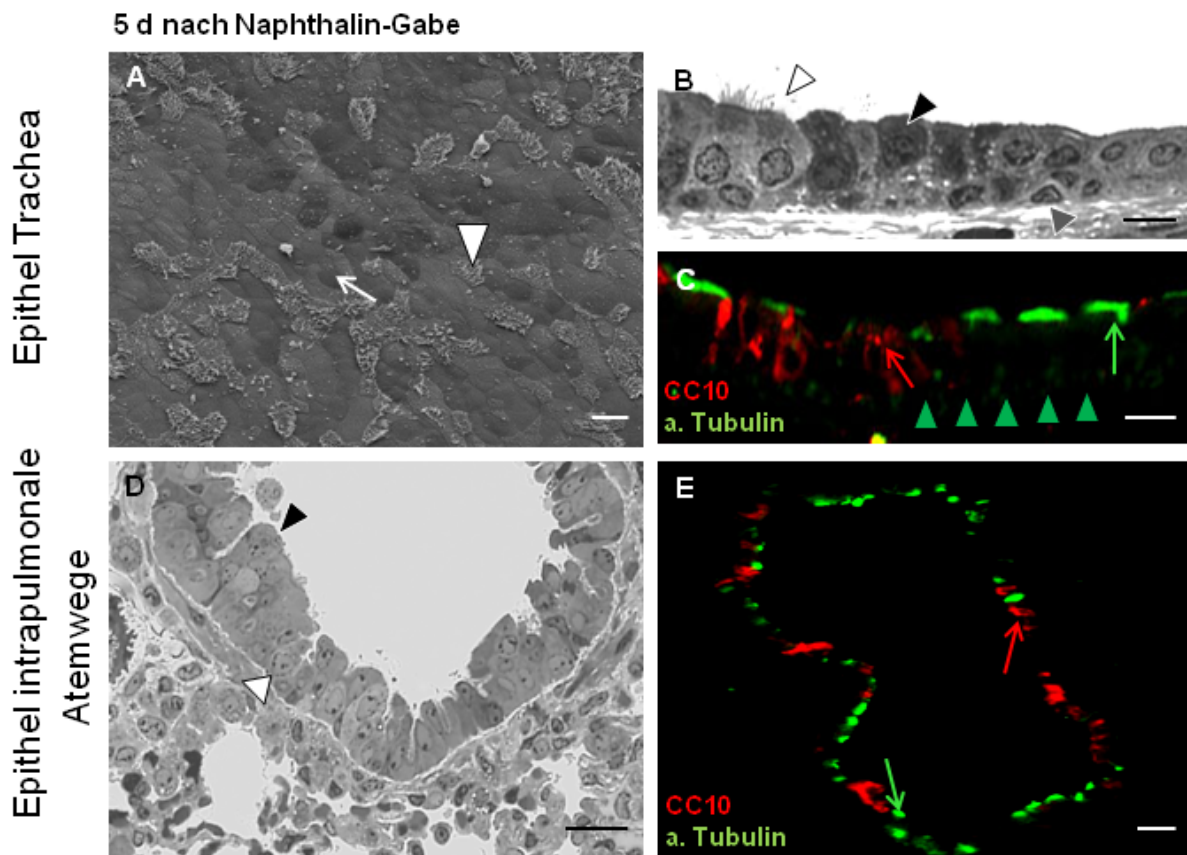


Abbildung 14 Atemwegsepithel der Maus 5 d nach Naphthalin-Gabe.

A-C) Epithel der Trachea. A) REM-Aufnahme: Weiter differenzierter Epithelverband mit einheitlich langen und nur wenigen Zilien der zilientragenden Zellen (weiße Pfeilspitze) und nicht-zilientragenden Zellen (weißer Pfeil) in der Trachea der Maus. B) Semidünnschnitt des Epithels: nicht-zilientragende Zellen (schwarze Pfeilspitze) und zilientragende Zellen (weiße Pfeilspitze) sowie Basalzellen (graue Pfeilspitze). C) Immunfluoreszenzmarkierung vom Trachealepithel: sekretorische Zellen (rot sowie roter Pfeil, Antikörper gegen CC10) und Zilien der zilientragenden Zellen (grün sowie grüner Pfeil, Antikörper gegen acetyliertes Tubulin (a. Tubulin)), Basalmembran (grüne Pfeilspitzen). D+E) Epithel der intrapulmonalen Atemwege. D) Semidünnschnitt des Epithels der Lunge. Nicht-zilientragende Zellen (schwarze Pfeilspitze), zilientragende Zellen (weiße Pfeilspitze). E) Immunfluoreszenzmarkierung: sekretorische Zellen (rot sowie roter Pfeil, Antikörper gegen CC10) und Zilien der zilientragenden Zellen (grün sowie grüner Pfeil, Antikörper gegen acetyliertes Tubulin (a. Tubulin)). REM/Semidünnschnitt: 4 Experimente mit jeweils 2 Mäusen (n=8, 6 Tiere hatten auf Naphthalin angesprochen). IHC: 5 Experimente mit jeweils 2 Mäusen (n=10, 6 Tiere hatten auf Naphthalin angesprochen). Maßstab entspricht 20 μm .

Epithel 6 d nach Naphthalin-Gabe: vermehrte Zilien auf zilientragenden Zellen

6 d nach Naphthalin-Gabe (Abbildung 15) waren vermehrt Zilien zilientragender Zellen zu beobachten (Abbildung 15A sowie 15B). Pyramidenförmige Basalzellen befanden sich zwischen den differenzierten Zellen auf der Basalmembran (Abbildung 15B). In der Immunhistologie waren nicht-zilientragende Zellen mit schwacher CC10-Markierung zu sehen (Abbildung 15C).

In den intrapulmonalen Atemwegen waren zilientragende und nicht-zilientragende Zellen im Epithel vorhanden (Abbildung 15D). CC10-positive Zellen (nicht-zilientragenden Zellen) und acetyliertes Tubulin-immunreaktive Zellen (Zilien der zilientragenden Zellen) waren im Epithelverband erkennbar (Abbildung 15E).

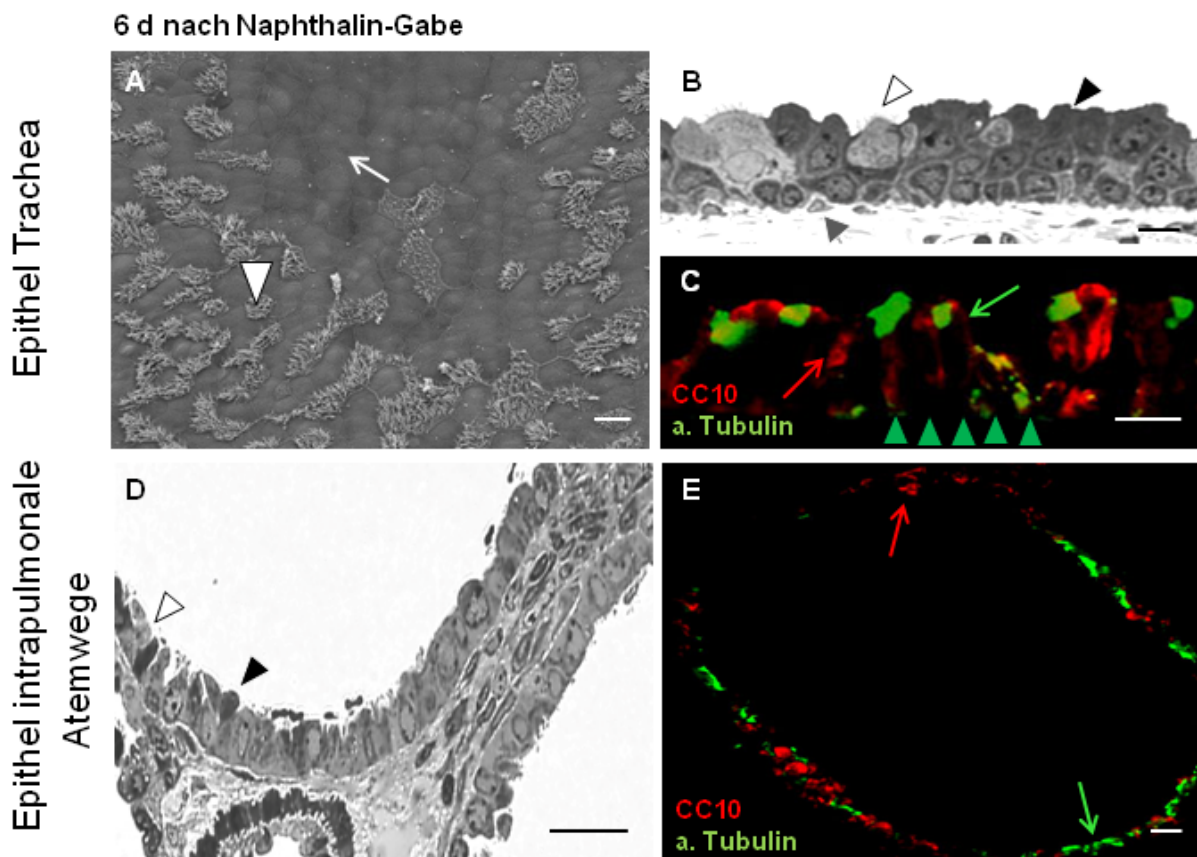


Abbildung 15 Atemwegsepithel der Maus 6 d nach Naphthalin-Gabe.

A-C) Epithel der Trachea. A) REM-Aufnahme: differenziertes Epithel mit nicht-zilientragenden Zellen (weißer Pfeil) und zilientragenden Zellen (weiße Pfeilspitze) in der Trachea der Maus. B) Semidünnschnitt des Epithels: nicht-zilientragende Zellen (schwarze Pfeilspitze) und zilientragende Zellen (weiße Pfeilspitze) sowie Basalzellen (graue Pfeilspitze). C) Immunfluoreszenzmarkierung vom Trachealepithel: sekretorische Zellen (rot sowie roter Pfeil, Antikörper gegen CC10) und Zilien der zilientragenden Zellen (grün sowie grüner Pfeil, Antikörper gegen acetyliertes Tubulin (a. Tubulin)), Basalmembran (grüne Pfeilspitzen). D+E) Epithel der intrapulmonalen Atemwege. D) Semidünnschnitt des Epithels der Lunge mit nicht-zilientragenden Zellen (schwarze Pfeilspitze) und zilientragenden Zellen (weiße Pfeilspitze). E) Immunfluoreszenzmarkierung: sekretorische Zellen (rot sowie roter Pfeil, Antikörper gegen CC10) und Zilien der zilientragenden Zellen (grün sowie grüner Pfeil, Antikörper gegen acetyliertes Tubulin (a. Tubulin)). REM/Semidünnschnitt: 3 Experimente mit jeweils 2 Mäusen (n=6, 5 Tiere hatten auf Naphthalin angesprochen). IHC: 4 Experimente mit jeweils 2 Mäusen (n=8, 4 Tiere hatten auf Naphthalin angesprochen). Maßstab entspricht 20 µm.

Epithel 15 d nach Naphthalin-Gabe: komplett regeneriertes Atemwegsepithel

15 d nach Naphthalin-Gabe (Abbildung 16) war ein komplett neu regenerierter Epithelverband der Trachea mit zilientragenden und nicht-zilientragenden Zellen vorhanden (Abbildung 16A, 16B sowie 16C). Die pyramidenförmigen Basalzellen befanden sich auf der Basalmembran zwischen den zilientragenden und nicht-zilientragenden Zellen (Abbildung 16B). Die nicht-zilientragenden Zellen waren überwiegend CC10-immunreaktiv und die Zilien zilientragender Zellen wurden durch Antikörper gegen acetyliertes Tubulin markiert (Abbildung 16C).

In den intrapulmonalen Atemwegen waren neben den zilientragenden Zellen die sekretorischen Zellen im Epithel ebenfalls ausdifferenziert (Abbildung 16D). Zilien der zilientragenden Zellen wurden durch acetyliertes Tubulin positiv angefärbt (Abbildung 16E). Die sekretorischen Zellen (CC10-positiv) waren immunhistochemisch wieder regelmäßig nachweisbar und überragten die zilientragenden Zellen (Abbildung 16E). Nicht-zilientragende Zellen zeigten eine sehr starke Markierung mit anti-CC10 Antikörper (Abbildung 16C und 16E).

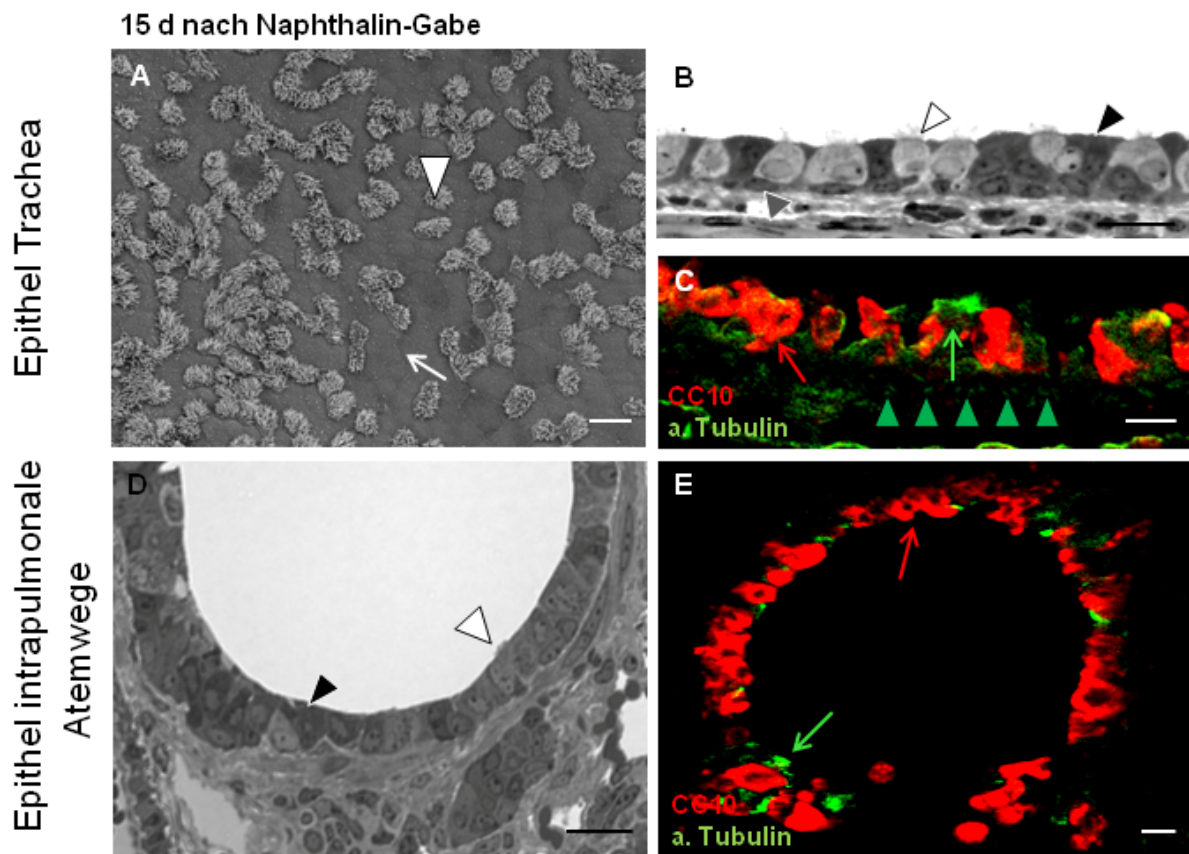


Abbildung 16 Atemwegsepithel der Maus 15 d nach Naphthalin-Gabe.

A-C) Epithel der Trachea. A) REM-Aufnahme: regenerierter Epithelverband mit zilientragenden (weiße Pfeilspitze) und nicht-zilientragenden Zellen (weißer Pfeil) in der Trachea der Maus. B) Semidünnschnitt des Epithels: nicht-zilientragende Zellen (schwarze Pfeilspitze) und zilientragende Zellen (weiße Pfeilspitze) sowie Basalzellen (graue Pfeilspitze). C) Immunfluoreszenzmarkierung vom Trachealepithel: sekretorische Zellen (rot sowie roter Pfeil, Antikörper gegen CC10) und Zilien der zilientragenden Zellen (grün sowie grüner Pfeil, Antikörper gegen acetyliertes Tubulin (a. Tubulin)), Basalmembran (grüne Pfeilspitzen). D+E) Epithel der intrapulmonalen Atemwege. D) Semidünnschnitt des Epithels der Lunge mit zilientragenden (weiße Pfeilspitze) und nicht-zilientragenden Zellen (schwarze Pfeilspitze). E) Immunfluoreszenzmarkierung: sekretorische Zellen (rot sowie roter Pfeil, Antikörper gegen CC10) und Zilien der zilientragenden Zellen (grün sowie grüner Pfeil, Antikörper gegen acetyliertes Tubulin (a. Tubulin)). REM/Semidünnschnitt sowie IHC: 3 Experimente mit jeweils 2 Mäusen (n=6). Maßstab entspricht 20 µm.

Zusammenfassung der Regeneration des Atemwegsepithels nach Naphthalin-Gabe

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass durch Naphthalin neben den nicht-zilientragenden Zellen auch die zilientragenden Zellen vom Epithel der Trachea innerhalb von 48 h nach Naphthalin-Gabe gelöst wurden. Ein neuer Epithelverband war erst 72 h (3 d) nach Naphthalin-Gabe wieder vorhanden. Hier waren bereits erste kurze Zilien zu verzeichnen. Der CC10-Nachweis (nicht-zilientragende Zellen) begann ab 5 d nach Naphthalin-Gabe. 15 d nach Naphthalin-Gabe war das Epithel der Trachea wieder komplett regeneriert.

In den intrapulmonalen Atemwegen wurden die nicht-zilientragenden Zellen innerhalb von 24 h aus dem Epithelverband gelöst und die zilientragenden Zellen breiteten sich flach auf der Basalmembran aus. Die Zilien der zilientragenden Zellen waren morphologisch nicht erkennbar, dagegen wurde immunhistochemisch acetyliertes Tubulin in den Zellen, die flach auf der Basalmembran aufsaßen, nachgewiesen. Zwischen 60 h (2,5 d) und 4 d nach Naphthalin-Gabe wurden nicht-zilientragende Zellen wieder beobachtet. 15 d nach Naphthalin-Gabe war das Lungenepithel wieder regeneriert.

4.2.3 Untersuchung der mRNA-Expression von CC10, CYP2F2 und FoxJ1 im Trachealepithel im Zeitraum von 48 h bis 15 d

Neben den rasterelektronmikroskopischen Aufnahmen, den Semidünnschnitten und den immunhistochemischen Färbungen wurde das Trachealepithel der Maus zusätzlich mittels quantitativer Real-Time PCR untersucht. Hier sollte analysiert werden, ob sich auf mRNA-Ebene Unterschiede in der Expression von CC10 (exprimiert in nicht-zilientragenden Zellen), CYP2F2 (exprimiert in nicht-zilientragenden Zellen) und FoxJ1 (exprimiert in zilientragenden Zellen) nach Naphthalin-Gabe gegenüber den jeweiligen Kontrollen ergaben.

Im Folgenden werden jeweils die ΔC_T - Mittelwerte (MW) angegeben. Die ΔC_T -Werte wurden durch den Vergleich mit den C_T -Werten des *housekeeping* Gens MLN51 errechnet (siehe Methodenteil).

Die auffällig starken Schwankungen innerhalb der einzelnen Zeitpunkte sind wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass Tiere in die Auswertung gingen, deren Epithel nicht auf Naphthalin reagiert hat. Diese „non-responder“ Tiere (gemessen an den Ergebnissen der histologischen Untersuchungen jedes 5,6. Tier) zeigten in allen Genen eine hohe Expression. Betrachtet man beispielsweise die höchste Expression von CC10 60 h nach Naphthalin-Gabe (60 h NA), so hatte dieses Tier ebenfalls eine hohe Expression bei CYP2F2 (60 h NA) und FoxJ1 (60 h NA). Dieses traf ebenfalls auf hohe Expressionen anderer Tiere zu anderen Zeitpunkten zu. In die statistische Auswertung wurden jedoch alle Tiere mit einbezogen.

MLN51 war zu den unterschiedlichen Zeitpunkten (48 h bis 15 d) in den Kontroll- und den Naphthalin-behandelten Tieren mit geringen Schwankungen exprimiert (Abbildung 17), was darauf hindeutet, dass bei allen Zeitpunkten vergleichbare Mengen mRNA gewonnen wurde.

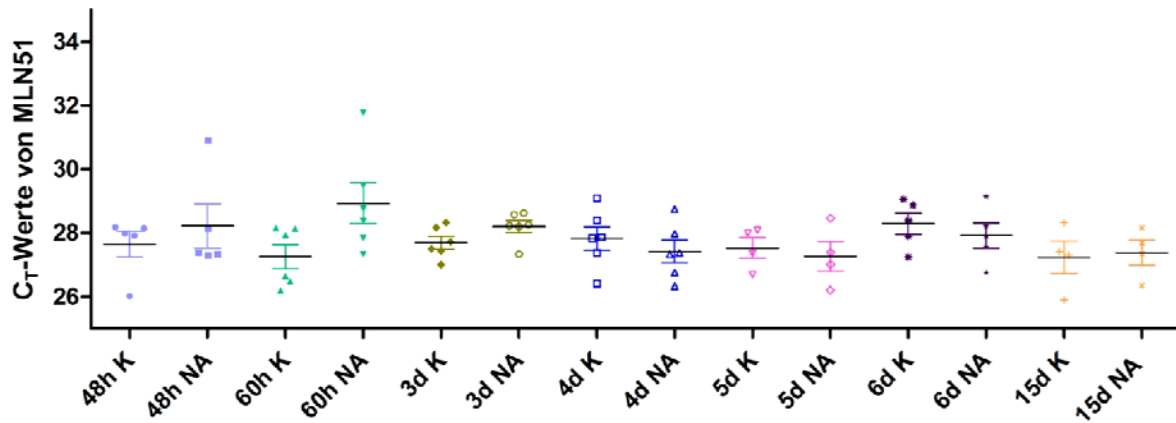


Abbildung 17 mRNA-Expression von MLN51 in den Epithelzellen für die einzelnen Zeitpunkte (48 h bis 15 d) der mit Naphthalin (NA) behandelten Tiere und den jeweiligen Kontrollen (K). Ein Datenpunkt zeigt die Messung der mRNA-Expression von MLN51 aus einer Maus. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt und davon die MW berechnet. Es werden jeweils die Mittelwerte mit dem Standardfehler angegeben. 3 Experimente mit jeweils 2 Mäusen ($n=6$, bei $n=4$ sind 2 Naphthalin-behandelte Tiere nach Applikation von Naphthalin und vor der qRT-PCR Untersuchung gestorben, die dazugehörigen Kontrollen wurden nicht aufgeführt).

Abnahme der mRNA-Expression von CC10 verbunden mit Zellverlust des Trachealepithels

CC10 ist ein Clarazell-spezifisches, 10 kDa großes Protein, welches in den sekretorischen nicht-zilientragenden Zellen sekretiert wird.

CC10 (Abbildung 18) wurde zu allen Zeitpunkten (48 h bis 15 d) in den Kontroll-Tieren ähnlich stark exprimiert. 48 h nach Naphthalin-Gabe nahm die Expression von CC10 leicht ab und wies einen ΔC_T -Wert von 9,87 auf, wohingegen die Kontrollen einen ΔC_T -Wert von 11,11 hatten. Diese auffällig geringe Expressionsverminderung kam eventuell aufgrund abgelöster Zellen, deren mRNA gemessen wurde, zustande. Eine signifikante mRNA-Expressionsabnahme von 10,65 (Kontrolle) auf 5,63 war 60 h nach Naphthalin-Gabe zu sehen. Ein signifikanter Expressionsabnahme von 10,24 (Kontrolle) auf 4,74 war ebenfalls in den Tieren 3 d nach Naphthalin-Gabe zu erkennen. In den Tieren 4 d nach Naphthalin-Gabe nahm der ΔC_T -Wert signifikant von 10,57 (Kontrollen) auf einen ΔC_T -Wert von 4,39 ab. 5 d nach Naphthalin-Gabe war die CC10-Expression nicht signifikant von 11,19 (Kontrollen) auf einen ΔC_T -Wert von 8,66 verringert. 6 d nach Naphthalin-Gabe war eine signifikante mRNA-Expression von CC10 zu verzeichnen. Der ΔC_T -Wert war hier von 11,23 (Kontrollen) auf einen ΔC_T -Wert von 7,52 verringert. 15 d nach Naphthalin-Gabe war die mRNA-Expression von CC10 wieder normal verglichen mit den Kontrollen. Der ΔC_T -Wert lag in den Kontrollen bei 10,95 und in den Naphthalin-behandelten Tieren bei 10,91.

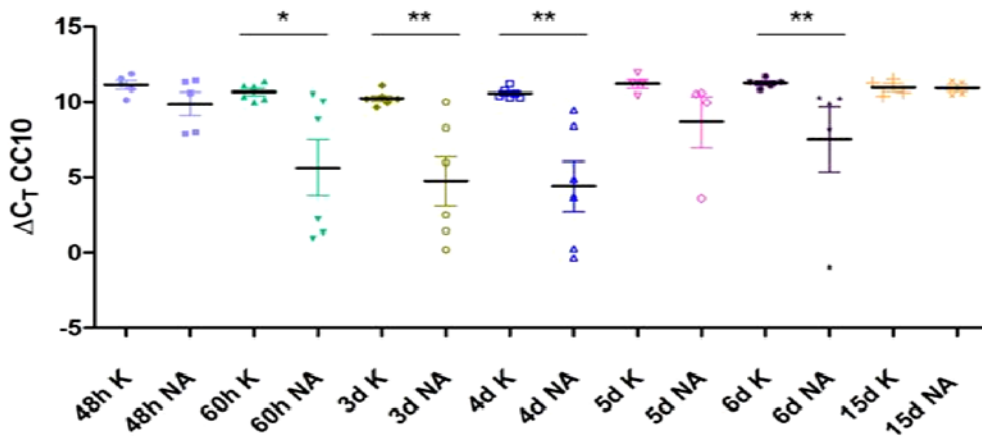


Abbildung 18 mRNA-Expression von CC10 in den Epithelzellen für die einzelnen Zeitpunkte (48 h bis 15 d) der mit Naphthalin (NA) behandelten Tiere und den jeweiligen Kontrollen (K). Ein Datenpunkt zeigt die Messung der mRNA-Expression von CC10 aus einer Maus. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt und davon die MW berechnet. Es werden jeweils die Mittelwerte mit dem Standardfehler angegeben. Die ΔC_T -Werte ergaben sich durch den Vergleich mit MLN51. 3 Experimente mit jeweils 2 Mäusen ($n=6$, bei $n=4$ sind 2 Naphthalin-behandelte Tiere nach Applikation von Naphthalin und vor der qRT-PCR Untersuchung gestorben, die dazugehörigen Kontrollen wurden nicht aufgeführt). Mann-Whitney Test. $P < 0,05$ (*). $P < 0,01$ (**).

mRNA-Expression von CYP2F2 im Trachealepithel

Neben der mRNA-Expression von CC10 wurde die mRNA-Expression von CYP2F2 (Abbildung 19) in den Epithelzellen der Trachea der Maus untersucht. CYP2F2 ist in den Clara-Zellen dafür verantwortlich, dass Naphthalin bei Bindung toxisch wirkt.

Die mRNA-Expression von CYP2F2 war, bis auf den Zeitpunkt 3 d nach Naphthalin-Gabe, über die einzelnen Zeitpunkte (48 h bis 15 d) nach Naphthalin-Gabe nicht signifikant verändert. In den Kontrollen wurde CYP2F2 mit einem ΔC_T -Wert-MW von 7,5 exprimiert. Die Expression von CYP2F2 war in den Naphthalin behandelten Tieren geringer als in den dazugehörigen Kontrollen. Bis auf jeweils einen Ausreißer bei 48 h (ΔC_T -Wert 1,025) und 60 h (ΔC_T -Wert -0,045) nach Naphthalin-Gabe entsprach das CYP2F2-Expressionsmuster dem Expressionsmuster von CC10.

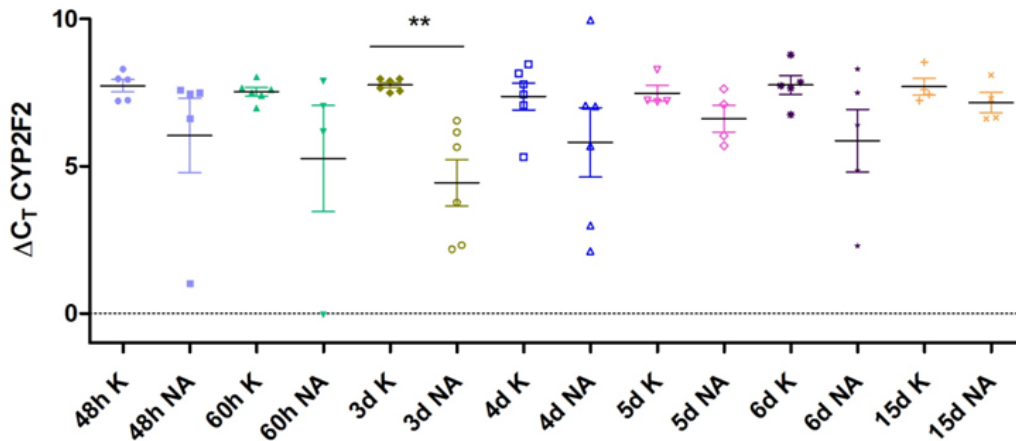


Abbildung 19 mRNA-Expression von CYP2F2 der einzelnen Zeitpunkte (48 h bis 15 d) für die Naphthalin (NA) behandelten Tiere mit den jeweiligen Kontrollen (K). Ein Datenpunkt zeigt die Messung der mRNA-Expression von CYP2F2 aus einer Maus. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt und davon die MW berechnet. Es werden jeweils die Mittelwerte mit dem Standardfehler angegeben. Die ΔC_T -Werte ergaben sich durch den Vergleich mit MLN51. 3 Experimente mit jeweils 2 Mäusen (n=6, bei n=4 sind 2 Naphthalin-behandelte Tiere nach Applikation von Naphthalin und vor der qRT-PCR Untersuchung gestorben, die dazugehörigen Kontrollen wurden nicht aufgeführt. Bei 60 h NA konnte die Expression von CYP2F2 bei 2 Tieren nicht detektiert werden.). Mann-Whitney Test. $P < 0,01$ (**).

Abnahme der mRNA-Expression von FoxJ1 verbunden mit Zellverlust des Trachealepithels

FoxJ1 ist ein Transkriptionsfaktor, welcher für die Differenzierung von zilienträgenden Zellen notwendig ist.

FoxJ1 (Abbildung 20) wurde zu allen Zeitpunkten (48 h bis 15 d) mit einem ähnlich starken MW zwischen 0,6 und 1,3 bei den Kontroll-Tieren exprimiert. 48 h nach Naphthalin-Gabe zeigte die Expression von FoxJ1 keinen signifikanten Unterschied zwischen den Kontroll- (ΔC_T -Wert von 0,58) und den Naphthalin-behandelten Tieren (ΔC_T -Wert von 0,39). Es war eine auffällig geringe Expressionsverminderung zu sehen. Aufgrund der hohen Expression wurde hier höchstwahrscheinlich die mRNA abgelöster Zellen gemessen. 60 h nach Naphthalin-Gabe war die FoxJ1 mRNA-Expression von 0,73 (Kontrollen) auf einen ΔC_T -Wert von -1,31 nicht signifikant verringert, welches auf „non-responder“ zurückzuführen ist. Es wurden wahrscheinlich Zellen nachgewiesen, die nicht mehr auf dem Trachealepithel saßen. Eine signifikante Abnahme war 3 d nach Naphthalin-Gabe nachzuweisen. Hier war der ΔC_T -Wert von 1,29 (Kontrollen) auf -1,16 verringert. 4 d nach Naphthalin-Gabe war der ΔC_T -Wert signifikant auf -1,53 verringert. 5 d nach Naphthalin-Gabe war zwar im Mittel eine verminderte Expression im Vergleich zu den Kontrollen zu finden (ΔC_T -Wert 1,85 vs. 0,73). Dieser Unterschied war aber nicht mehr signifikant. Bei den Tieren 6 d und 15 d nach Naphthalin-Gabe war die FoxJ1-Expression auf gleichem Niveau wie die der Kontrollen. Der ΔC_T -Wert an Tag 6 lag bei 0,15 und am Tag 15 bei 1,02.

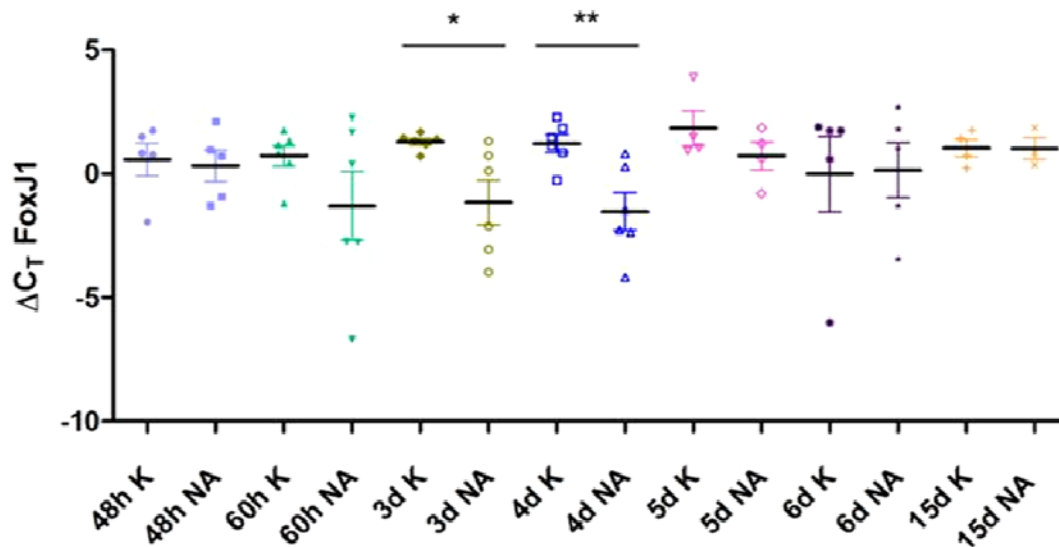


Abbildung 20 mRNA-Expression von FoxJ1 der einzelnen Zeitpunkte (48 h bis 15 d) für die Naphthalin (NA) behandelten Tiere mit den jeweiligen Kontrollen (K). Ein Datenpunkt zeigt die Messung der mRNA-Expression von FoxJ1 aus einer Maus. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt und davon die MW berechnet. Es werden jeweils die Mittelwerte mit dem Standardfehler angegeben. Die ΔC_T -Werte ergaben sich durch den Vergleich mit MLN51. 3 Experimente mit jeweils 2 Mäusen ($n=6$, bei $n=4$ sind 2 Naphthalin-behandelte Tiere nach Applikation von Naphthalin und vor der qRT-PCR Untersuchung gestorben, die dazugehörigen Kontrollen wurden nicht aufgeführt). Mann-Whitney Test. $P < 0,05$ (*). $P < 0,01$ (**).

Die mRNA-Expressionen von CC10 (nicht-zilientragende Zellen), CYP2F2 (sekretorischen Zellen) und FoxJ1 (zilientragende Zellen) spiegelten die Ergebnisse der histologischen Untersuchungen der Epithelzellen wieder. 48 h nach Naphthalin-Gabe wurde eine geringe Expressionsverminderung von CC10 und FoxJ1 beobachtet. Dies lag vermutlich an der Expression der mRNA abgelöster Zellen. 60 h nach Naphthalin-Gabe waren keine zilientragenden und nicht-zilientragenden Zellen mehr auf dem Trachealepithel vorhanden, welches durch die Expressionsabnahme in der CC10 und FoxJ1 mRNA-Expression bestätigt wurde. 3 d und 4 d nach Naphthalin-Gabe war die CC10 und FoxJ1 mRNA-Expression signifikant verringert im Vergleich zu den Kontrollen. Diese verminderte Expression deutet auf eine geringe Anzahl nicht-zilientragender und zilientragender Zellen hin. Welche ebenfalls in der Histologie beobachtet wurde, wo das Epithel wenige zilientragende sowie nicht-zilientragende Zellen (in der IHC) aufwies. Erst während der Expressionszunahme von CC10 und FoxJ1 ab 5 d nach Naphthalin-Gabe waren die nicht-zilientragenden Zellen wieder immunhistochemisch anfärbbar. Obwohl davon ausgegangen wird, dass CYP2F2 nur in sekretorischen Zellen vorhanden ist, war die Expression über den gemessenen Zeitraum nur 3 d nach Naphthalin-Gabe signifikant verändert.

4.2.4 Morphologische Veränderung der Basalzellen im Trachealepithel der Maus während der Regeneration

Naphthalin schädigte die sekretorischen und die zilientragenden Zellen im Trachealepithel der Maus, so dass sich diese aus dem Epithel gelöst haben. Die Basalzellen verblieben währenddessen auf der Basalmembran (Abbildung 21). 12 h und 24 h nach Naphthalin-Gabe zeigten die Basalzellen keine morphologischen Veränderungen. 48 h nach Naphthalin-Gabe waren die Basalzellen vergrößert. 60 h und 72 h (3 d) nach Naphthalin-Gabe waren mehrere Zellreihen an Basalzellen unterschiedlicher Größe vorhanden. Nach 4 d waren die Basalzellen zwar vergrößert, aber lediglich in einer Zellreihe vorzufinden. Ab 5 d nach Naphthalin-Gabe hatten die Basalzellen ihre ursprüngliche Form und Größe wieder zurückerlangt. In den bereits oben gezeigten Semidünnschnitten konnten ebenfalls morphologische Veränderungen der Basalzellen beobachtet werden. Durch die Markierung der Basalzellen mit dem Antikörper gegen p75 werden diese Beobachtungen hier bestätigt.

Während der Regeneration veränderten die Basalzellen ihre Form von pyramidenförmig zu rundlich/oval, Größe und Anzahl bis sie nach der Regeneration wieder in ihrer ursprünglichen Form (pyramidenförmig) und Größe die Basalmembran bedeckten.

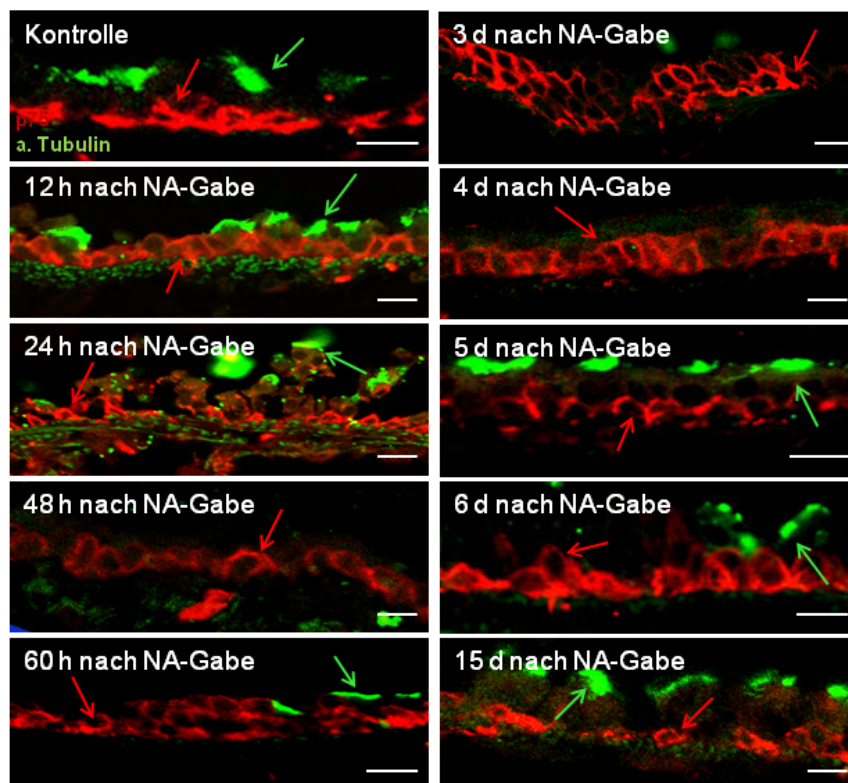


Abbildung 21 Basalzellen im Trachealepithel der Maus *in vivo* während der epithelialen Regeneration. Veränderung der Basalzellen (rot sowie roter Pfeil, Antikörper gegen p75) im Verlauf der Regeneration bis Tag 15 nach NA (Naphthalin-Gabe). Basalzellen (roter Pfeil), Zilien der zilientragenden Zellen (grün sowie grüner Pfeil, Antikörper gegen acetyliertes Tubulin (a. Tubulin)). 3 bis 5 Experimente mit jeweils 2 Mäusen (n=6-10). Maßstab entspricht 20 μ m.

Gleichbleibende mRNA-Expression von CK5 verbunden mit verbleibenden Basalzellen im Trachealepithel

Die immunhistologischen Untersuchungen haben gezeigt, dass Basalzellen während der Schädigung mit Naphthalin auf dem Trachealepithel der Maus verblieben. Cytokeratin 5 (CK5) ist ein Intermediärfilament und wird in den Basalzellen exprimiert.

Die mRNA-Expression von CK5 (Abbildung 22) blieb über die einzelnen Zeitpunkte (48 h bis 15 d) nach Naphthalin-Gabe verglichen mit den jeweiligen Kontrollen konstant. Es konnten keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden.

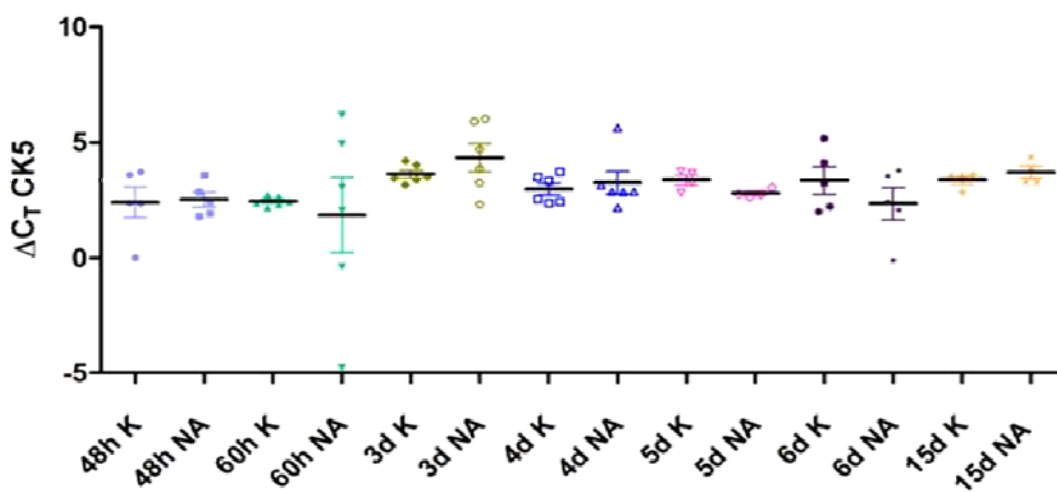


Abbildung 22 mRNA-Expression von CK5 der einzelnen Zeitpunkte (48 h bis 15 d) für die Naphthalin (NA) behandelten Tiere mit den jeweiligen Kontrollen (K). Ein Datenpunkt zeigt die Messung der mRNA-Expression von CK5 aus einer Maus. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt und davon die MW berechnet. Es werden jeweils die Mittelwerte mit dem Standardfehler angegeben. Die ΔC_T -Werte ergaben sich durch den Vergleich mit MLN51. 3 Experimente mit jeweils 2 Mäusen (n=6, bei n=4 sind 2 Naphthalin-behandelte Tiere nach Applikation von Naphthalin und vor der qRT-PCR Untersuchung gestorben, die dazugehörigen Kontrollen wurden nicht aufgeführt). Mann-Whitney Test nicht signifikant.

4.2.5 Proliferationsanstieg im Trachealepithel von 24 h (1 d) bis 5 d nach Naphthalin-Gabe

Da die Basalzellen die verbleibenden Zellen in der Trachea waren und diese ab 48 h nach Naphthalin-Gabe ihre Morphologie veränderten, sollte herausgefunden werden, ob diese Zellen proliferierten (Abbildung 23). Für die Untersuchung der Proliferation wurde in der Immunhistochemie eine Doppelmarkierung mit einem Antikörpergemisch gegen acetyliertes Tubulin und phospho-Histon H3 verwendet. Aufgrund großer Streuung wurde der Median angegeben.

In den Kontroll-Tieren war eine geringe Zellproliferation von 0% bis 6% zu beobachten. Während die Zellproliferation in den Naphthalin-behandelten Tieren ab 24 h (1 d) bis 4 d

stetig anstieg. 24 h nach Naphthalin-Gabe war die Zellproliferation mit 13% signifikant erhöht. 48 h nach Naphthalin-Gabe war eine signifikante Erhöhung proliferierender Zellen von 27,5% zu verzeichnen. 60 h nach Naphthalin-Gabe war die Proliferation mit 13,5% der Epithelzellen ebenfalls signifikant erhöht. Signifikant erhöhte Proliferationen mit 18% wurden 3 d und mit 46% wurden 4 d nach Naphthalin-Gabe beobachtet. Dagegen proliferierten nur 3% der Epithelzellen 5 d nach Naphthalin-Gabe und 7,5% 6 d nach Naphthalin-Gabe.

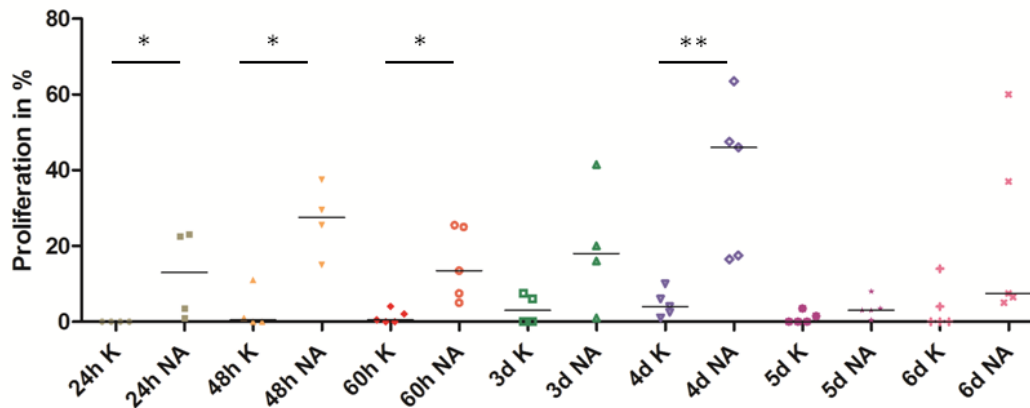


Abbildung 23 Zellproliferation im Trachealepithel 24 h bis 6 d nach Naphthalin-Gabe (NA) im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen (K). Ein Datenpunkt zeigt die Messung der Zellproliferation aus 200 zufällig gezählten Epithelzellen aus einer Trachea. Es wird jeweils der Median angegeben. 2 bis 3 Experimente mit jeweils 2 Mäusen (n=4-6). Mann-Whitney Test. $P < 0,05$ (*). $P < 0,01$ (**).

Die Proliferation der Trachealepithelzellen der Maus (Abbildung 24) nahm über den Zeitverlauf von 24 h (1 d) bis 4 d nach Naphthalin-Gabe gegenüber ihren Kontrollen signifikant zu. Ab 5 d nach Naphthalin-Gabe waren bis auf die beiden Ausreißer bei 6 d nach Naphthalin-Gabe nur noch geringe Zellproliferationen messbar.

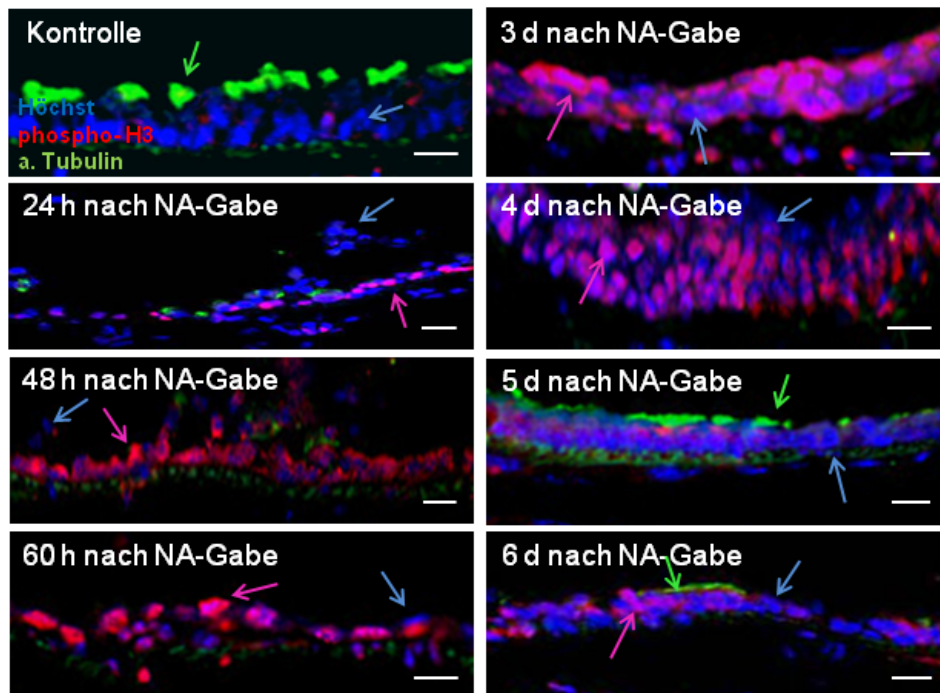


Abbildung 24 Proliferation der Epithelzellen der Trachea der Maus *in vivo* nach Naphthalin-Gabe (NA). Zellkerne (blauer Pfeil, Hoechstmarkierung), proliferierende Zellen (rosa sowie rosa Pfeil, Antikörper gegen phospho-H3), Zilien der zilientragenden Zellen (grüner Pfeil, Antikörper gegen acetyliertes Tubulin (a. Tubulin)). 3 bis 5 Experimente mit jeweils 2 Mäusen (n=6-10).

4.3 Zilienschlag und Partikeltransport während und nach der Regeneration des Trachealepithels

Das Trachealepithel der Maus regenerierte sich bis 15 d nach Naphthalin-Gabe, so dass sekretorische und zilientragende Zellen wieder normal im Verband vorhanden waren. Für eine gut funktionierende Abwehr müssen Partikel vom Trachealepithel nach der Regeneration wieder effektiv transportiert werden können.

Es wurden die Zeitpunkte 4 d und 15 d nach Naphthalin-Gabe analysiert. Der Zeitpunkt 4 d wurde gewählt, weil hier bereits erste kurze Zilien auf den zilientragenden Zellen des Trachealepithels vorhanden waren und somit ein eventueller Partikeltransport möglich gewesen wäre.

15 d nach Naphthalin-Gabe war das Trachealepithel regeneriert und besaß sekretorische und zilientragende Zellen wie ein gesundes Epithel. Zu diesem Zeitpunkt sollte der Partikeltransport wieder gewährleistet werden.

Es werden im Text jeweils die Mittelwerte (MW) in Hertz (Hz) für den Zilienschlag und die MW in Mikrometer/Sekunde ($\mu\text{m/s}$) für den Partikeltransport angegeben.

Gleichbleibender Zilienschlag während (4 d) und nach (15 d) der Regeneration im Trachealepithel der Maus nach Naphthalin-Gabe

Um herauszufinden, ob die neu gebildeten Zilien der zilientragenden Zellen nach der Regeneration bereits wieder eine normale Schlagfrequenz besaßen, wurden pro Trachea jeweils fünf verschiedene Bereiche zilientragender Zellen aufgenommen und fünf bis sieben Zellen je Bereich ausgewertet (Abbildung 25).

Die Zilien der zilientragenden Zellen in den 4 d Kontroll-Tieren (Abbildung 25, siehe Film 1 auf der beiliegenden DVD) besaßen eine mittlere Zilienschlagfrequenz von 26,13 Hz. Die Zilien der zilientragenden Zellen der mit Naphthalin behandelten Tiere besaßen eine mittlere Frequenz von 24,39 Hz. Mit Zugabe von ATP stieg die Frequenz der Zilien in den Kontroll- und Naphthalin-behandelte Tieren auf 32,38 Hz beziehungsweise 32,20 Hz an.

Die Zilien der zilientragenden Zellen in den 15 d Kontroll-Tieren besaßen eine mittlere Zilienschlagfrequenz von 22,63 Hz. Dagegen besaßen die Zilien der mit Naphthalin behandelten Tiere eine mittlere Schlagfrequenz von 26,64 Hz. Wurde ATP hinzugefügt, so stieg die Frequenz der Zilien in den Kontroll-Tieren auf 29,92 Hz und bei den Zilien der Naphthalin-behandelte Tiere auf 30,41 Hz.

Während (4 d) und nach der Regeneration (15 d) war die mittlere Zilienschlagfrequenz der Tiere, die Naphthalin erhalten haben vergleichbar mit den Kontroll-Tieren (siehe Film 1 bis Film 4 auf der beiliegenden DVD).

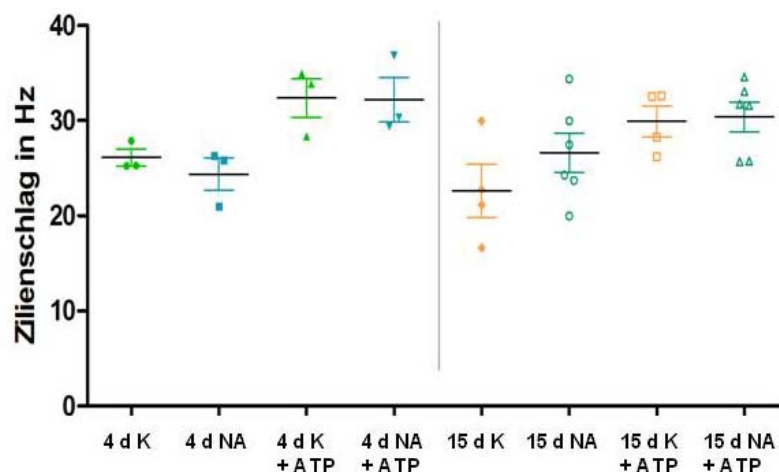


Abbildung 25 Zilienschlag in Hz zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten: 4 d und 15 d nach Naphthalin-Gabe (NA) im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen (K). Ein Datenpunkt zeigt die durchschnittliche Zilienschlagfrequenz einer Messung des Zilienschlags einer Maustrachea. Dabei wurden fünf Epithelareale mit fünf bis sieben zilientragenden Zellen untersucht und davon der mittlere Zilienschlag berechnet. Es wird jeweils der Mittelwert mit dem Standardfehler angegeben. 3 bis 6 Experimente mit jeweils 1 Maus (n=3-6). Mann-Whitney Test nicht signifikant.

Verminderter Partikeltransport 4 d nach Naphthalin-Gabe und normaler Transport nach 15 d

Die Zilienschlagfrequenz der zilientragenden Zellen war während und nach der Regeneration nicht beeinträchtigt. Im Weiteren wurde untersucht, ob das regenerierende (4 d nach Naphthalin-Gabe) bzw. regenerierte (15 d nach Naphthalin-Gabe) Trachealepithel in der Lage ist Partikel ordnungsgemäß zu transportieren.

Es werden im Text jeweils die MW in Mikrometer/Sekunde ($\mu\text{m/s}$) für den mittleren Partikeltransport angegeben. Für die Berechnung der Geschwindigkeit der Partikel wurden fünf verschiedene Bereiche pro Trachea aufgenommen und die einzelnen Partikelgeschwindigkeiten berechnet.

Die mittlere zilienvermittelte Transportgeschwindigkeit (Abbildung 26, siehe Film 5 auf der beiliegenden DVD) in den 4 d Kontroll-Tieren betrug $59,49 \mu\text{m/s}$. In den mit Naphthalin-behandelten Tieren lag die mittlere Transportgeschwindigkeit dagegen bei $31,19 \mu\text{m/s}$ (siehe Film 6 auf der beiliegenden DVD). Nach Zugabe von ATP stieg die Geschwindigkeit des Transportes in den Kontroll-Tieren auf $88,99 \mu\text{m/s}$ an und verringerte sich in den Naphthalin-behandelten Tieren auf $26,85 \mu\text{m/s}$. Aufgrund der geringen Anzahl an Tieren (3 Tiere) konnte keine statistischen Tests verwendet werden.

Die mittlere Transportgeschwindigkeit in den 15 d Kontroll-Tieren betrug $61,67 \mu\text{m/s}$ (siehe Film 7 auf der beiliegenden DVD). Nach Zugabe von ATP stieg diese auf eine mittlere Geschwindigkeit von $76,83 \mu\text{m/s}$ an. Das zilientragende Epithel der 15 d Naphthalin-behandelten Tiere transportierte Partikel mit einer mittleren Geschwindigkeit von $48,94 \mu\text{m/s}$ (siehe Film 8 auf der beiliegenden DVD). Diese Geschwindigkeit war nicht signifikant mit $64,15 \mu\text{m/s}$ bei Zugabe von ATP.

Während (4 d nach Naphthalin-Gabe) der Regeneration war der Partikeltransport noch nicht gewährleistet, wobei die Geschwindigkeit des Partikeltransportes nach der Regeneration (15 d nach Naphthalin-Gabe) wieder gewährleistet war.

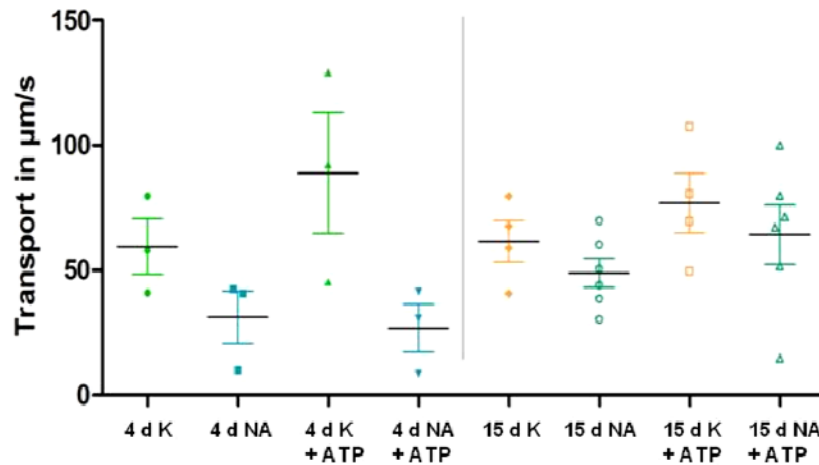


Abbildung 26 Partikeltransport in $\mu\text{m/s}$ für die Zeitpunkte 4 d und 15 d nach Naphthalin-Gabe (NA) im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen (K). Ein Datenpunkt zeigt die Messung des Partikeltransportes aus einer Mastrachea. Dabei wurden fünf Epithelareale untersucht und davon der mittlere Partikeltransport berechnet. Es wird jeweils der Mittelwert mit dem Standardfehler angegeben. 3 bis 6 Experimente mit jeweils 1 Maus ($n=3-6$). Mann-Whitney Test nicht signifikant.

4.4 Beeinflussung der Regeneration des Trachealepithels der Maus durch einmalige Gabe von Lipopolysacchariden (LPS)

Für die Beeinflussung der Regeneration durch LPS wurden zwei verschiedene Zeitpunkte gewählt. Der Interventionszeitpunkt 48 h nach Naphthalin-Gabe wurde gewählt, weil hier alle nicht-zilientragenden und zilientragenden Zellen das Epithel verlassen haben und somit nur noch proliferierende Basalzellen vorhanden waren. Der Interventionszeitpunkt 60 h nach Naphthalin-Gabe wurde gewählt, da dies der früheste Zeitpunkt der beginnenden Differenzierung war.

Gestörte Regeneration des Trachealepithels der Maus 4 d nach Naphthalin-Gabe nach zusätzlicher LPS-Intervention

In den Kontroll-Tracheen (Abbildung 27), die nur mit LPS behandelt wurden, war das Trachealepithel nach 4 d unverändert zu Kontroll-Tieren ohne LPS-Intervention. Nicht-zilientragende sowie zilientragende Zellen entsprachen eines gesunden Trachealepithels (Abbildung 27A, 27B sowie 27C).

Ohne Intervention mit LPS differenzierten die Epithelzellen 4 d nach Naphthalin-Gabe, wobei unterschiedlich lange Zilien erkennbar waren (Abbildung 27D). Die Größe der Zellen entsprach jedoch morphologisch bereits den Zellen aus einem gesunden Trachealepithel (Abbildung 27D und 27E). Eine Expression von CC10 konnte immunhistochemisch noch nicht nachgewiesen werden (Abbildung 27F).

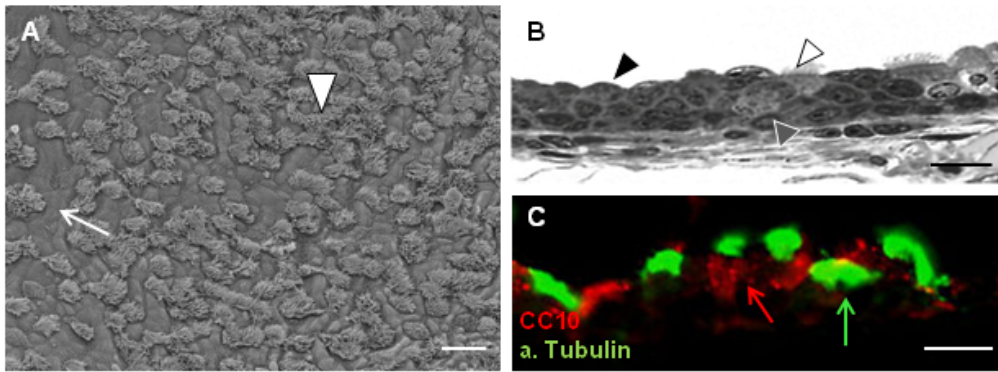
Wurde 48 h nach Naphthalin-Gabe mit LPS interveniert, fanden sich an Tag 4 nach Naphthalin-Gabe nur Basalzellen und abgestorbene Zellen (Abbildung 27G und 27H). Nicht-

zilientragende und zilientragende Zellen waren im Lumen der Trachea nachweisbar (Abbildung 27I).

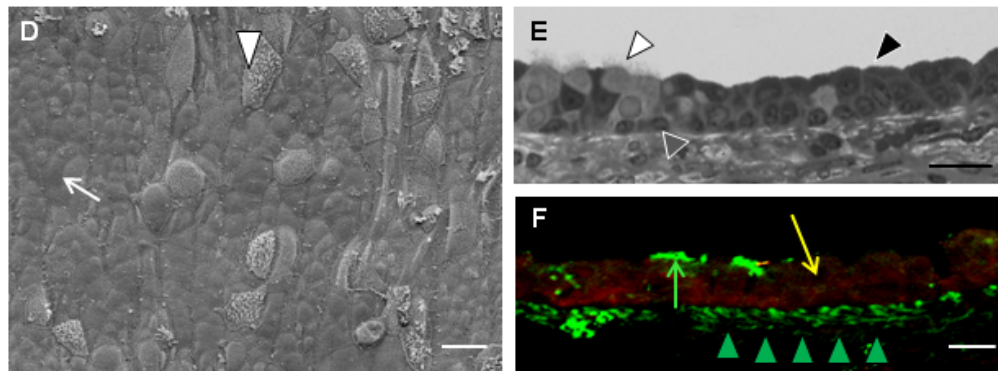
Wurde dagegen 60 h nach Naphthalin-Gabe mit LPS interveniert, waren 4 d nach Naphthalin-Gabe erste differenzierte Zellen vorhanden (Abbildung 27J). Hier waren die Zellen jedoch morphologisch noch stark vergrößert und einige Bereiche abgetragen (Abbildung 27J). Im Semidünnschnitt dagegen waren sehr viele Epithelzellen zu erkennen (Abbildung 27K). Zilientragende Zellen (acetyliertes Tubulin-positiv) konnten im Epithel nachgewiesen werden. Zusätzlich fanden sich CC10-immunreaktive Zellen im Atemwegsepithel (Abbildung 27L).

In den REM-Untersuchungen zeigte sich, dass LPS den Regenerationsablauf des Trachealepithels veränderte, da 4 d nach Naphthalin-Gabe ohne Intervention mit LPS das Trachealepithel morphologisch klarer abgrenzbare zilientragende und nicht-zilientragende Zellen aufwies. Einzig die CC10-immunreaktiven Zellen der Naphthalin-behandelten Tiere, die nach 60 h mit LPS interveniert wurden, deuten auf eine beschleunigte Regeneration des Trachealepithels hin (Abbildung 27L).

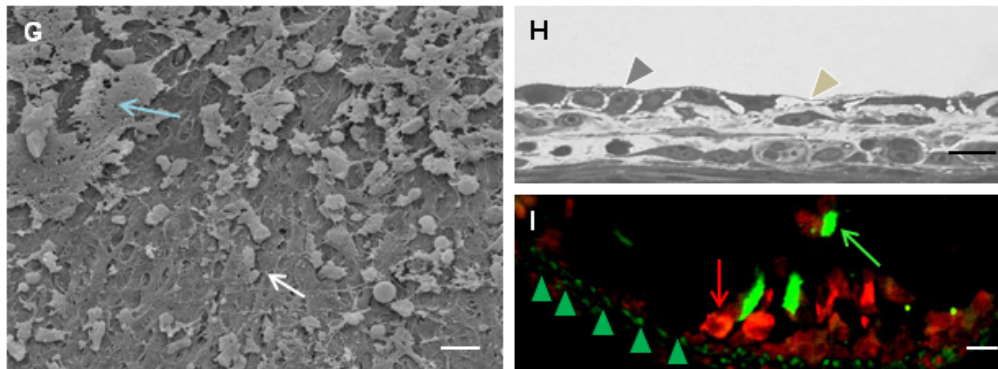
4 d Kontrolle: LPS-Intervention nach Vehikel-Gabe



4 d nach Naphthalin-Gabe



4 d nach NA-Gabe: LPS-Intervention 48 h nach NA-Gabe



4 d nach NA-Gabe: LPS-Intervention 60 h nach NA-Gabe

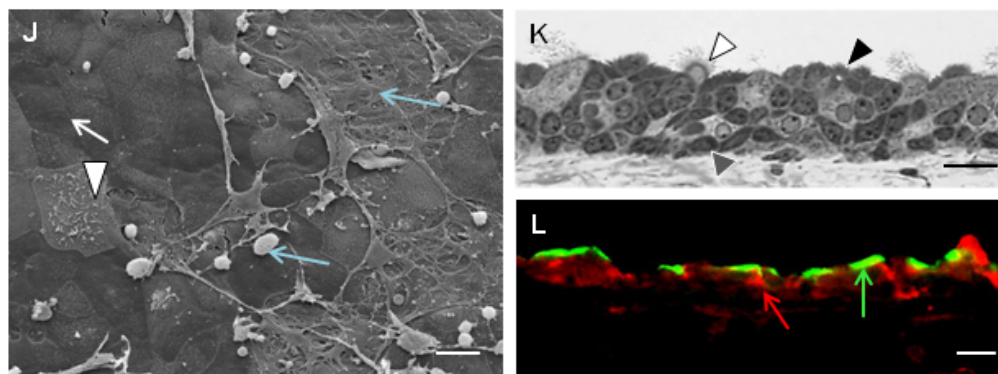


Abbildung 27 Trachealepithel der Maus nach 4 d: Kontrolle mit LPS-Intervention, Naphthalin (NA) ohne LPS, Naphthalin mit LPS-Intervention nach 48 h und Naphthalin mit LPS-Intervention nach 60 h.

A-C) Epithel einer Kontroll-Trachea nach 4 d mit LPS-Intervention. REM/Semidünnschnitt: 3 Experimente mit jeweils 2 Mäusen (n=6). IHC: 4 Experimente mit jeweils 2 Mäusen (n=8). D-F) Epithel 4 d nach NA-Gabe. /Semidünnschnitt: 3 Experimente mit

jeweils 2 Mäusen (n=4/6, 4 Tiere hatten auf Naphthalin angesprochen). IHC: 4 Experimente mit jeweils 2 Mäusen (n=8, 7 Tiere hatten auf Naphthalin angesprochen). G-I) Epithel 4 d nach NA-Gabe mit LPS-Intervention nach 48 h. REM/Semidünnschnitt: 3 Experimente mit jeweils 2 Mäusen (n=6). IHC: 4 Experimente mit jeweils 2 Mäusen (n=8). J-L) Epithel 4 d nach NA-Gabe mit LPS-Intervention nach 60 h. REM/Semidünnschnitt: 3 Experimente mit jeweils 2 Mäusen (n=6, 4 Tiere hatten auf Naphthalin angesprochen). IHC: 4 Experimente mit jeweils 2 Mäusen (n=8, 7 Tiere hatten auf Naphthalin angesprochen).

(A, D, G, J) REM-Aufnahme des Epithels: Nicht-zilientragende Zellen (weißer Pfeil), zilientragende Zellen (weiße Pfeilspitze), abgestorbene Zellen (hellblauer Pfeil). (B, E, H, K) Semidünnschnitt des Epithels: nicht-zilientragende Zellen (schwarze Pfeilspitze), zilientragende Zellen (weiße Pfeilspitze), Basalzellen (graue Pfeilspitze). (C, F, I, L) Immunfluoreszenzmarkierung vom Epithel: sekretorische Zellen (rot sowie roter Pfeil, Antikörper gegen CC10), Zilien der zilientragenden Zellen (grün sowie grüner Pfeil, Antikörper gegen acetyliertes Tubulin (α-Tubulin)), Basalmembran (grüne Pfeilspitzen), ungefärbte Zellen (gelber Pfeil). Maßstab entspricht 20 µm.

Gestörte Regeneration des Epithels in den intrapulmonalen Atemwegen 4 d nach Naphthalin-Gabe nach zusätzlicher LPS-Intervention

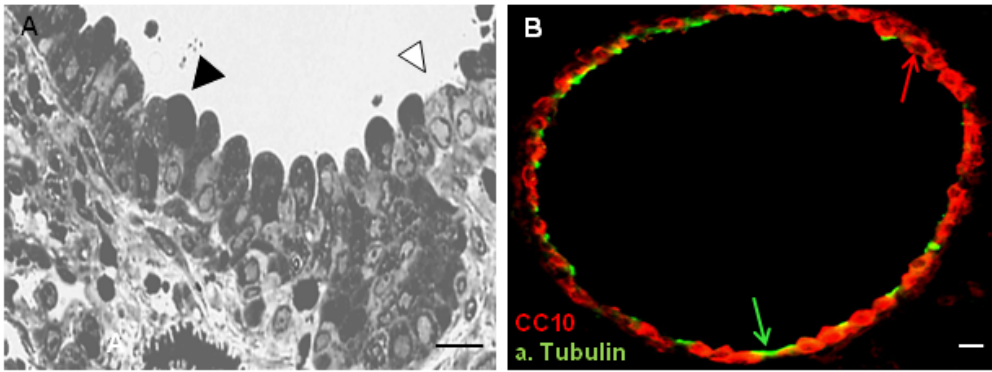
In den intrapulmonalen Atemwegen (Abbildung 28) waren in den Kontroll-Tracheen, die nur LPS bekommen haben, nach 4 d keine morphologischen Veränderungen der nicht-zilientragenden und zilientragenden Zellen zu erkennen (Abbildung 28A sowie 28B).

Ohne Intervention mit LPS waren 4 d nach Naphthalin-Gabe zilientragende und nicht-zilientragende Zellen im Semidünnschnitt vorhanden (Abbildung 28C). CC10-immunreaktiven Zellen konnten wie in der Trachea nicht nachgewiesen werden (Abbildung 28D).

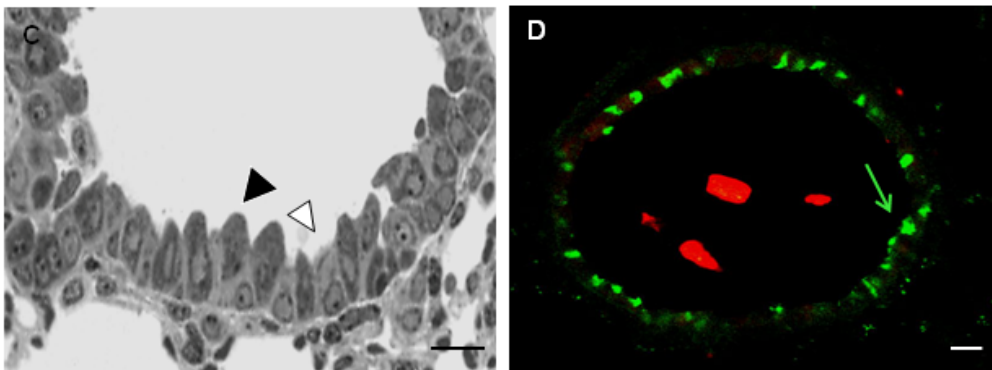
Wurde 48 h nach Naphthalin-Gabe mit LPS interveniert, waren in den intrapulmonalen Atemwegen 4 d nach Naphthalin-Gabe ein einschichtiges Epithel und abgestorbene Zellen im Lumen vorhanden (Abbildung 28E). Neben den sekretorischen Zellen befanden sich außerdem neutrophile Granulozyten im Lumen (Abbildung 28E). Die Zilien der zilientragenden Zellen waren im Semidünnschnitt morphologisch nicht erkennbar (Abbildung 28E), jedoch wurde in der IHC acetyliertes Tubulin in Zellen, die flach auf der Basalmembran aufsaßen, nachgewiesen (Abbildung 28F).

Wurde nach 60 h mit LPS interveniert, war in den intrapulmonalen Atemwegen 4 d nach Naphthalin-Gabe ein gestörtes Epithel mit abgestorbenen sowie neutrophile Granulozyten im Lumen vorhanden (Abbildung 28G). Während die Zilien im Semidünnschnitt morphologisch nicht sichtbar waren, konnte acetyliertes Tubulin in Zellen, die flach auf der Basalmembran aufsaßen, nachgewiesen werden (Abbildung 28H). Außerdem konnten sekretorische Zellen (CC10-positiv) immunhistochemisch nachgewiesen werden (Abbildung 28H).

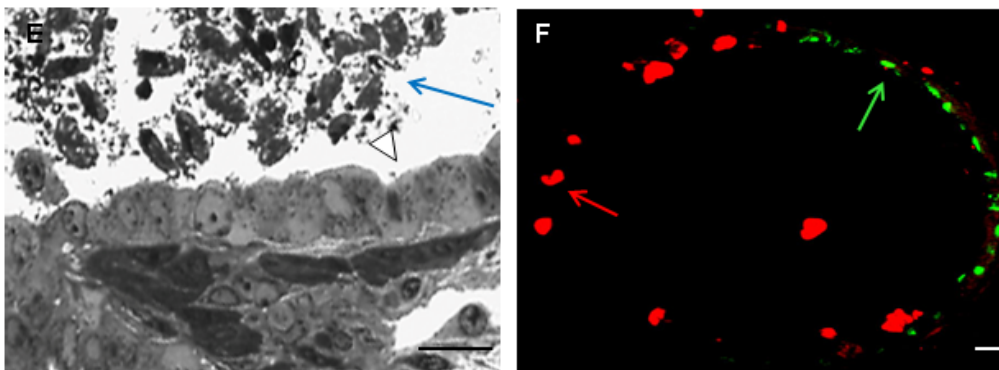
4 d Kontrolle: LPS-Intervention nach Vehikel-Gabe



4 d nach Naphthalin-Gabe



4 d NA: LPS-Intervention 48 h nach Naphthalin-Gabe



4 d NA: LPS-Intervention 60 h nach Naphthalin-Gabe

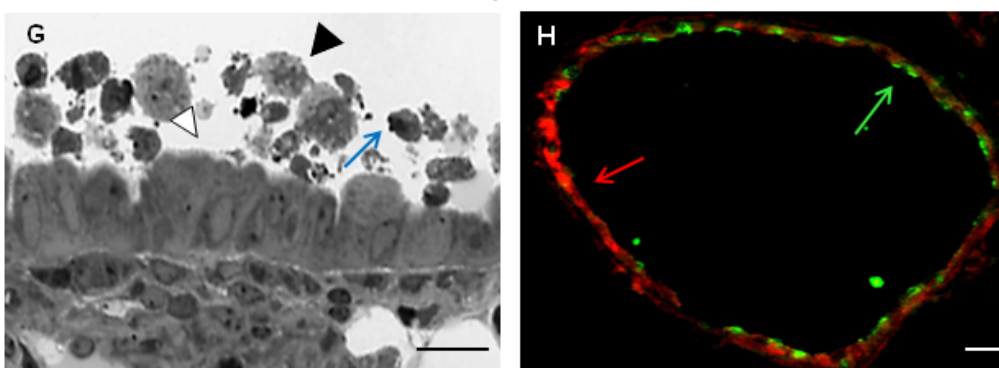


Abbildung 28 Epithel der intrapulmonalen Atemwege der Maus nach 4 d: Kontrolle mit LPS-Intervention, Naphthalin ohne LPS, Naphthalin mit LPS-Intervention nach 48 h und Naphthalin mit LPS-Intervention nach 60 h.

A+B) Epithel einer Kontroll-Lunge nach 4 d mit LPS-Intervention. REM/Semidünnschnitt: 3 Experimente mit jeweils 2 Mäusen (n=6). IHC: 4 Experimente mit jeweils 2 Mäusen (n=8). C+D) Epithel 4 d nach NA-Gabe. REM/Semidünnschnitt: 3 Experimente mit jeweils 2 Mäusen (n=6, 4 Tiere hatten auf Naphthalin angesprochen). IHC: 4

Experimente mit jeweils 2 Mäusen (n=8, 7 Tiere hatten auf Naphthalin angesprochen). E+F) Epithel 4 d nach NA-Gabe mit LPS-Intervention nach 48 h. REM/Semidünnschnitt: 3 Experimente mit jeweils 2 Mäusen (n=6). IHC: 4 Experimente mit jeweils 2 Mäusen (n=8). G+H) Epithel 4 d nach NA-Gabe mit LPS-Intervention nach 60 h. REM/Semidünnschnitt: 3 Experimente mit jeweils 2 Mäusen (n=6, 4 Tiere hatten auf Naphthalin angesprochen). IHC: 4 Experimente mit jeweils 2 Mäusen (n=8, 7 Tiere hatten auf Naphthalin angesprochen).

(A, C, E, G) Semidünnschnitt des Epithels der Lunge: Nicht-zilientragende Zellen (schwarze Pfeilspitze), zilientragende Zellen (weiße Pfeilspitze), abgestorbene Zellen (blauer Pfeil). (B, D, F, H) Immunfluoreszenzmarkierung des Epithels: sekretorische Zellen (rot sowie roter Pfeil, Antikörper gegen CC10) und Zilien der zilientragenden Zellen (grün sowie grüner Pfeil, Antikörper gegen acetyliertes Tubulin (a. Tubulin)). Maßstab entspricht 20 μ m.

4.4.1 mRNA-Expression von CC10, CYP2F2 und FoxJ1 4 d nach Naphthalin-Gabe und LPS-Gabe

geringe Schwankungen der mRNA-Expression von CC10, CYP2F2 und FoxJ1 4 d nach Naphthalin-Gabe nach zusätzlicher LPS-Intervention im Vergleich zu 4 d nach Naphthalin-Gabe ohne LPS-Intervention

Das Trachealepithel nach Gabe von LPS wurde ebenfalls mittels quantitativer Real-Time PCR untersucht. Zunächst wurde die mRNA-Expression von CC10 analysiert (Abbildung 29). Es wurden jeweils die Mittelwerte der Expressionen im Text aufgeführt.

Es konnte kein Unterschied in der Expression von CC10 bei Behandlung mit LPS und ohne LPS nach 4 d in den Kontroll-Tieren verzeichnet werden. In den Naphthalin-behandelten Tieren ohne LPS war die Expression von CC10 signifikant geringer als in den Kontroll-Tieren (ΔC_T 10,57 (Kontroll-Tiere) vs. ΔC_T 4,39).

In den 4 d Tieren, die LPS 48 h nach Naphthalin-Gabe erhalten haben, war die CC10-Expression signifikant geringer als in den Kontroll-Tieren (ΔC_T 11,26 (Kontroll-Tiere) vs. ΔC_T 5,7).

Eine nicht signifikante Expressionsverringerung war in den 4 d Tieren, die LPS 60 h nach Naphthalin-Gabe verabreicht bekommen haben, zu sehen. Die Expression war geringer als in den Kontroll-Tieren (ΔC_T 11,06 (Kontroll-Tiere) vs. ΔC_T 4,22).

Die mRNA-Expression von CC10 wurde durch einmalige Gabe von LPS im Vergleich zu den Tieren, die kein LPS bekommen haben, in den Naphthalin-behandelten Tieren nicht beeinflusst. Hier wurden ähnliche CC10-Expressionen mit und ohne Intervention von LPS gemessen.

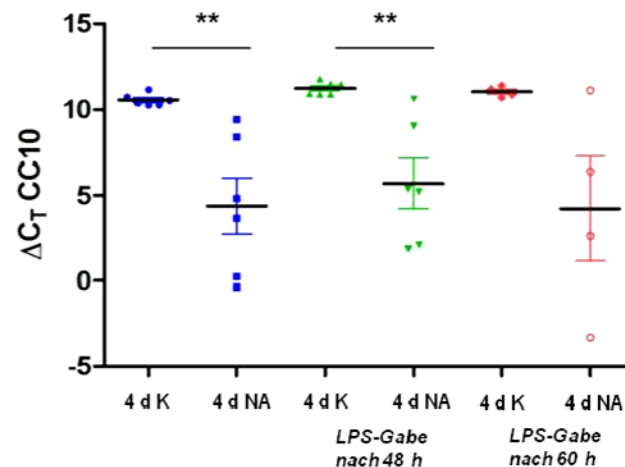


Abbildung 29 mRNA-Expression von CC10 4 d nach Vehikel- (K) bzw. Naphthalin-Gabe (NA) ohne und mit LPS. Ein Datenpunkt zeigt die Messung der mRNA-Expression von CC10 aus einer Maus. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt und davon die MW berechnet. Es wird jeweils der Mittelwert mit dem Standardfehler angegeben. Die ΔC_T -Werte ergaben sich durch den Vergleich mit MLN51. 3 Experimente mit jeweils 2 Mäusen (n=6, bei n=4 sind 2 Naphthalin-behandelte Tiere nach Applikation von Naphthalin und vor der qRT-PCR Untersuchung gestorben, die dazugehörigen Kontrollen wurden nicht aufgeführt). Mann-Whitney Test. $P < 0,01$ (**).

Die mRNA-Expression von CYP2F2 wurde ebenfalls analysiert (Abbildung 30). Hier wurden 4 d nach Naphthalin-Gabe ohne und mit LPS Intervention gegenüber den Kontroll-Tieren keine großen Unterschiede gemessen. Die CYP2F2-Expression in den Naphthalin-behandelten Tieren ohne LPS war geringer als in den Kontrollen (ΔC_T 7,37 (Kontroll-Tiere) vs. ΔC_T 5,81).

Eine signifikante Expressionsabnahme von CYP2F2 war in den 4 d Tieren, die LPS 48 h nach Naphthalin-Gabe erhalten haben, zu sehen. Hier war die Expression geringer als in den Kontroll-Tieren von einem (ΔC_T 7,49 (Kontroll-Tiere) vs. ΔC_T 3,85).

Die CYP2F2-Expression war in den 4 d Tieren, die LPS 60 h nach Naphthalin-Gabe verabreicht bekommen haben, geringer als in den Kontrollen (ΔC_T 7,18 (Kontroll-Tiere) vs. ΔC_T 4,34).

Die mRNA-Expression von CYP2F2 wurde durch eine einmalige Gabe von LPS nach Naphthalin-Gabe gegenüber den Naphthalin-behandelten Tieren, die kein LPS bekommen haben, nicht beeinflusst.

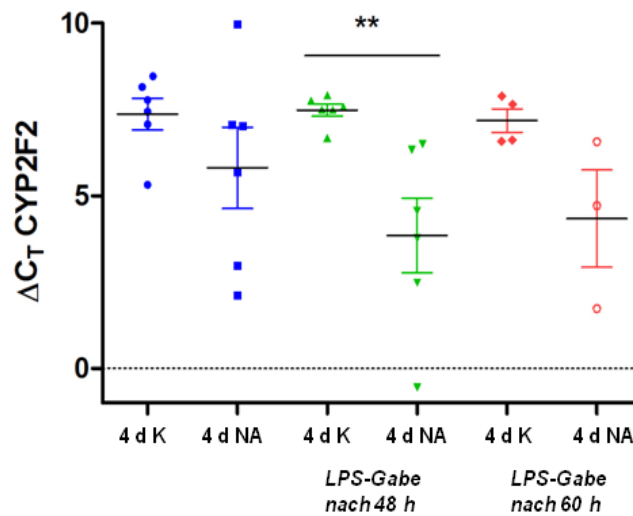


Abbildung 30 mRNA-Expression von CYP2F2 4 d nach Vehikel- (K) bzw. Naphthalin-Gabe (NA) ohne und mit LPS. Ein Datenpunkt zeigt die Messung der mRNA-Expression von CYP2F2 aus einer Maus. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt und davon die MW berechnet. Es wird jeweils der Mittelwert mit dem Standardfehler angegeben. Die ΔC_T -Werte ergaben sich durch den Vergleich mit MLN51. 3 Experimente mit jeweils 2 Mäusen ($n=6$, bei $n=4$ sind 2 Naphthalin-behandelte Tiere nach Applikation von Naphthalin und vor der qRT-PCR Untersuchung gestorben, die dazugehörigen Kontrollen wurden nicht aufgeführt. Bei dem Zeitpunkt 4 d NA, LPS-Gabe nach 60 h konnte die Expression von CYP2F2 in einem Tier nicht detektiert werden.). Mann-Whitney Test. $P < 0,01$ (**).

FoxJ1 (Abbildung 31) war in den Kontroll-Tieren ohne und mit LPS ähnlich stark exprimiert. In den Naphthalin-behandelten Tieren ohne LPS-Intervention war die FoxJ1-Expression signifikant geringer als in den Kontrollen (ΔC_T 1,22 (Kontroll-Tiere) vs. ΔC_T -1,53).

Eine signifikante FoxJ1-Expressionsabnahme war in den 4 d Tieren, die LPS 48 h nach Naphthalin-Gabe erhalten haben, gegenüber den Kontrollen ebenfalls messbar (ΔC_T 1,96 (Kontroll-Tiere) vs. ΔC_T -1,63).

Die FoxJ1-Expression war nicht signifikant geringer in den 4 d Tieren, denen LPS 60 h nach Naphthalin-Gabe verabreicht wurde, als in den Kontroll-Tieren (ΔC_T 1,79 (Kontroll-Tiere) vs. ΔC_T -2,85).

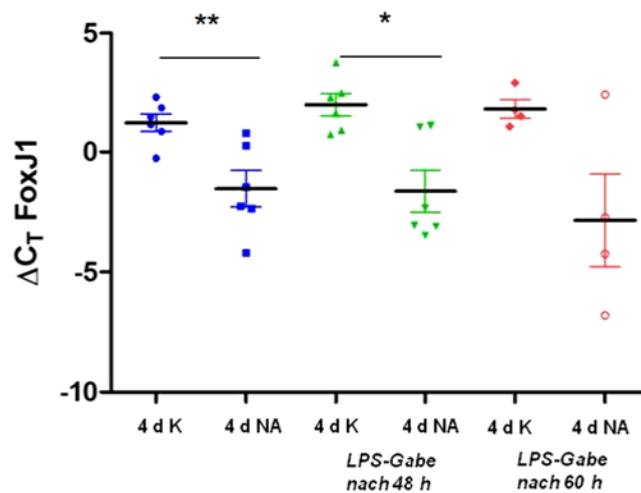


Abbildung 31 mRNA-Expression von FoxJ1 4 d nach Vehikel- (K) bzw. Naphthalin-Gabe (NA) ohne und mit LPS. Ein Datenpunkt zeigt die Messung der mRNA-Expression von FoxJ1 aus einer Maus. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt und davon die MW berechnet. Es werden jeweils die Mittelwerte mit dem Standardfehler angegeben. Die ΔC_T -Werte ergaben sich durch den Vergleich mit MLN51. 3 Experimente mit jeweils 2 Mäusen (n=6, bei n=4 sind 2 nach Applikation von Naphthalin und vor der qRT-PCR Untersuchung gestorben, die dazugehörigen Kontrollen wurden nicht aufgeführt). Mann-Whitney Test. $P < 0,05$ (*). $P < 0,01$ (**).

LPS hatten keinen Einfluss auf die mRNA-Expression von CC10, CYP2F2 und FoxJ1 in den 4 d Naphthalin-behandelten Tieren, die zusätzlich LPS erhalten haben, im Vergleich zu der mRNA-Expression der 4 d Naphthalin-behandelten Tiere, die kein LPS bekommen haben.

4.4.2 Basalzellen und Proliferation im Trachealepithel der Maus nach LPS-Intervention

Keine morphologische Veränderung der Basalzellen nach LPS-Intervention

Durch Intervention mit LPS nach Naphthalin-Gabe zeigten die Basalzellen keine morphologischen Veränderungen im Trachealepithel der Maus gegenüber den Kontrollen (Abbildung 32). Die Zellen erschienen normal im Epithelverband der Trachea der Maus.

In den Kontroll-Tracheen wurden keine Veränderungen der Basalzellen beobachtet (Abbildung 32A, C und E). Dagegen wurden in den 4 d Naphthalin-behandelten Tieren ohne LPS vergrößerte Basalzellen mit einer oval/rundlichen Form beobachtet (Abbildung 32B). Wurde nach Naphthalin-Gabe zusätzlich LPS verabreicht, hatten die Basalzellen im Gegensatz zu den Basalzellen nach Naphthalin-Gabe ohne LPS ihre Form und Größe nicht verändert und schienen wie in den Kontrollen pyramidenförmig zu sein (Abbildung 32D und F).

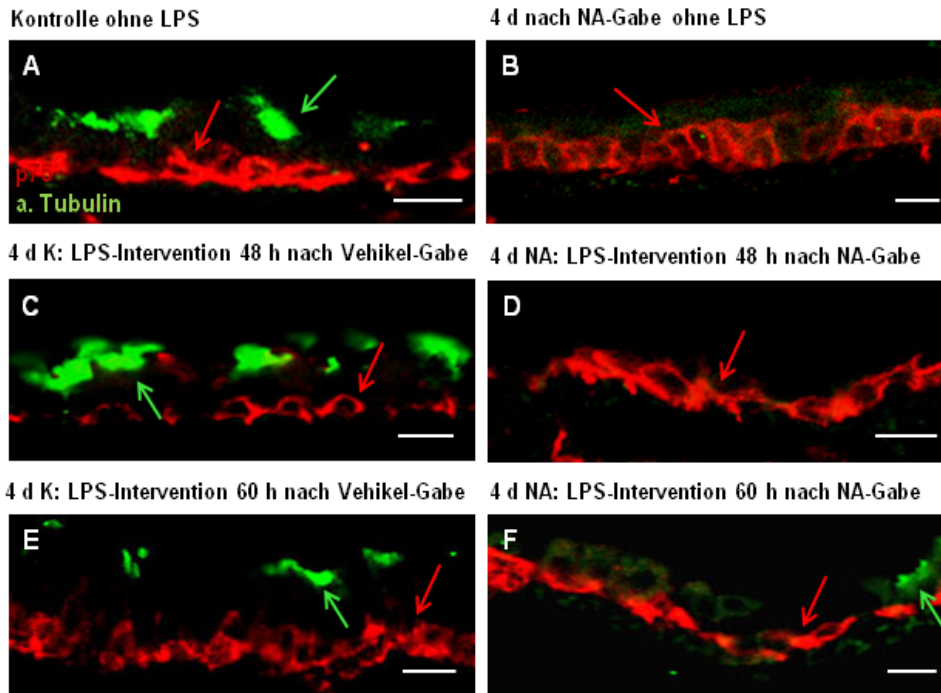


Abbildung 32 Basalzellen im Trachealepithel der Maus A+B) Kontrolle sowie 4 d nach Naphthalin (NA)-Gabe ohne LPS; C-F) 4 d nach Vehikel- (K) bzw. Naphthalin-Gabe mit LPS-Intervention nach 48 h bzw. 60 h. Basalzellen (rot sowie roter Pfeil, Antikörper gegen p75), Zilien der zilientragenden Zellen (grün sowie grüner Pfeil, Antikörper gegen acetyliertes Tubulin (a. Tubulin)). 4 Experimente mit jeweils 2 Mäusen (n=8). Maßstab entspricht 20 µm.

Die mRNA-Expression von CK5 (Abbildung 33) ohne LPS und mit LPS 48 h nach Naphthalin-Gabe war gegenüber ihren jeweiligen Kontrollen konstant und nicht signifikant verändert. Nach einmaliger LPS-Gabe 60 h nach Naphthalin-Gabe kam es zu einem leichten, jedoch nicht signifikanten mRNA-Expressionsanstieg von CK5 in den Basalzellen gegenüber den Kontrollen. Die geringe Tieranzahl in den 4 d Tieren, die nach 60 h LPS bekommen haben, ist auf 2 noch vor der Untersuchung verstorbene Tiere zurückzuführen.

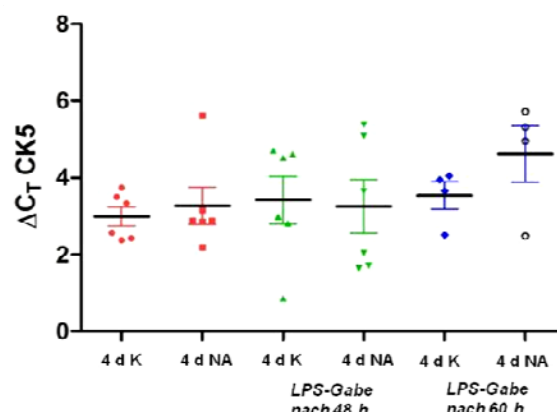


Abbildung 33 mRNA-Expression von CK5 4 d nach Vehikel- bzw. Naphthalin-Gabe ohne und mit LPS. Ein Datenpunkt zeigt das Ergebnis der CK5 mRNA-Expression einer Maus. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt und davon die MW berechnet. Es werden jeweils die Mittelwerte mit dem Standardfehler angegeben. Die ΔC_T -Werte ergaben sich durch den Vergleich mit dem *housekeeping* Gen MLN51. 3 Experimente mit jeweils 2 Mäusen (n=6, bei n=4 sind 2 Naphthalin-behandelte Tiere nach Applikation von Naphthalin und vor der qRT-PCR Untersuchung gestorben, die dazugehörigen Kontrollen wurden nicht aufgeführt). Mann-Whitney Test nicht signifikant.

Im Gegensatz zur alleinigen Naphthalin-Gabe wurde nur geringe Zellproliferation nach LPS-Intervention im Trachealepithel beobachtet

Die Zellproliferation in allen Kontroll-Tieren ohne und mit LPS schwankte zwischen 2% und 6% (Abbildung 34). In den 4 d Naphthalin-behandelten Tieren proliferierten 38,2% Zellen. Während in den 4 d Naphthalin-behandelten Tieren, die nach 48 h LPS bekommen haben, nur 7,88% proliferierende Zellen vorhanden waren. Eine ebenfalls geringe Zellproliferation von 6,79% war in den 4 d Naphthalin-behandelten Tieren, die nach 60 h LPS bekommen haben, zu verzeichnen. Diese geringe Zellproliferation in den Naphthalin-behandelten Tieren nach zusätzlicher LPS-Gabe wurde in der immunhistochemischen Färbung beobachtet (Abbildung 35).

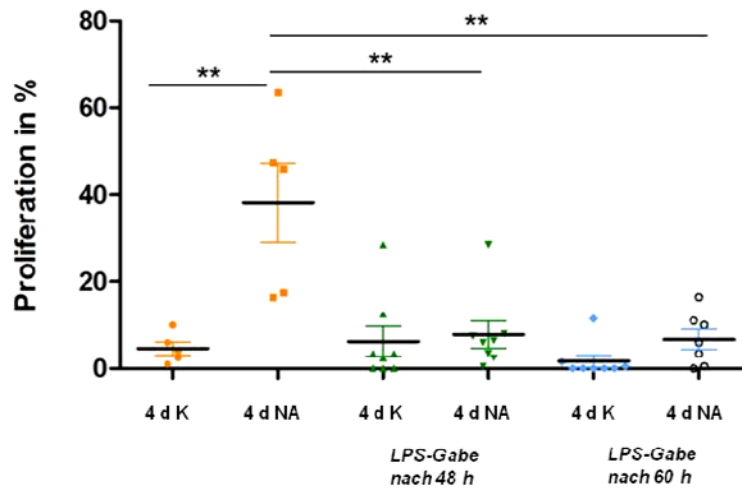


Abbildung 34 Zellproliferation im Trachealepithel 4 d nach Vehikel (K)- und Naphthalin (NA)-Gabe ohne LPS und mit LPS-Gabe nach 48 h bzw. nach 60 h. Ein Datenpunkt zeigt die Messung aus 200 zufällig gezählten Epithelzellen einer Trachea. Es werden jeweils die Mittelwerte mit dem Standardfehler angegeben. 3 bis 4 Experimente mit jeweils 2 Mäusen (n=6-8). Mann-Whitney Test. $P < 0,01$ (**).

Bei einmaliger Gabe von LPS, 48 h oder 60 h nach Naphthalin-Gabe, kam es im Vergleich zu den Tieren, die nur mit Naphthalin behandelt wurden, zu einer massiven Reduktion der Proliferationsrate.

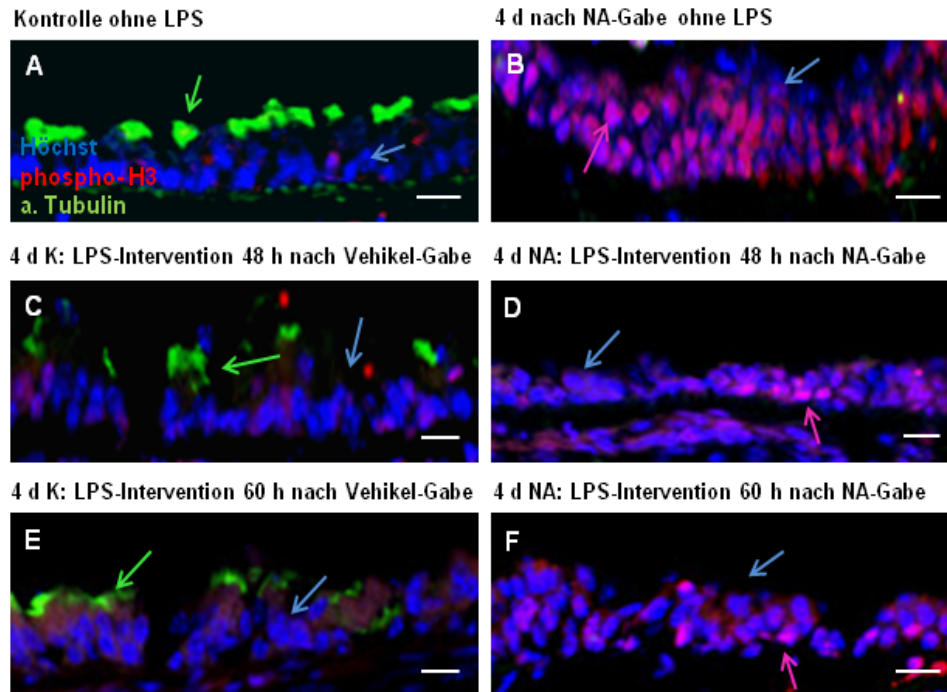


Abbildung 35 Zellproliferation im Trachealepithel der Maus A+B) Kontrolle sowie 4 d nach Naphthalin (NA)-Gabe ohne LPS; C-F) 4 d nach Vehikel (K)- und Naphthalin-Gabe mit LPS-Intervention nach 48 h bzw. 60 h. Proliferierende Zellen (rosa sowie rosa Pfeil, Antikörper gegen phospho-Histon H3), Zilien der zilientragenden Zellen (grün sowie grüner Pfeil, Antikörper gegen acetyliertes Tubulin (a. Tubulin)). 4 Experimente mit jeweils 2 Mäusen (n=8). Maßstab entspricht 20 µm.

4.5 Beeinflussung von Zilienschlag und Partikeltransport im Trachealepithel der Maus durch LPS-Intervention

Kein Unterschied der Zilienschlagfrequenz zu Kontroll-Tieren an Tag 15 nach Naphthalin-Gabe mit einmaliger LPS-Gabe

Die Zilienschlagfrequenz wurde 15 d nach Naphthalin-Gabe ohne LPS wie in den vorherigen Experimenten untersucht. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Zum Vergleich wurden die Daten der nur mit Naphthalin-behandelten Tieren hier noch einmal mit aufgeführt. Für die Berechnung der Zilienschlagfrequenz wurden pro Trachea jeweils fünf verschiedene Bereiche zilientragender Zellen aufgenommen und fünf bis sieben Zellen je Bereich ausgewertet. Im Folgenden werden immer die Mittelwerte (MW) der gemessenen Zilienschlagfrequenzen angegeben.

Die Zilien der zilientragenden Zellen der 15 d Kontroll-Tiere besaßen eine mittlere Zilienschlagfrequenz von 22,63 Hz (Abbildung 36). Wurde ATP hinzugefügt, so stieg diese

Frequenz auf 29,92 Hz. Dagegen besaßen die Zilien der mit Naphthalin-behandelten Tieren eine mittlere Frequenz von 26,64 Hz und bei Zugabe von ATP erhöhte sich die Frequenz nicht signifikant auf 30,41 Hz.

Eine mittlere Zilienschlagfrequenz von 22,89 Hz wurde in den 15 d Kontrollen gemessen, die nach 48 h LPS erhalten haben. Die Frequenz stieg hier nur minimal auf 26,32 Hz nach ATP-Zugabe an. Eine ähnliche mittlere Frequenz des Zilienschlags mit 24,27 Hz besaßen die Zilien der zilientragenden Zellen der 15 d Naphthalin-behandelten Tiere, die nach 48 h LPS erhalten haben. Hierbei erhöhte sich die mittlere Zilienschlagfrequenz bei ATP-Zugabe nicht signifikant auf 25,54 Hz.

Vergleichbare Frequenzergebnisse wiesen die Zilien der zilientragenden Zellen in den 15 d Kontroll-Tieren, die nach 60 h LPS erhalten haben. Hier betrug die mittlere Zilienschlagfrequenz 25,72 Hz. Diese Frequenz stieg nach ATP-Gabe auf 28,05 Hz an. Eine Zilienschlagfrequenz von 24,16 Hz wiesen die 15 d Naphthalin-behandelten Tiere, die nach 60 h LPS erhalten haben, auf. Diese erhöhte sich bei ATP-Zugabe nicht signifikant auf 26,02 Hz.

Es waren keine signifikanten Unterschiede des Zilienschlags zwischen den Kontrollen und den Naphthalin behandelten Tieren vorhanden.

Nach der Regeneration (15 d nach Naphthalin-Gabe) war die Frequenz des Zilienschlags der Naphthalin-behandelten Tiere gegenüber den Kontroll-Tieren geringfügig erhöht (siehe Filme 9 bis 11 auf der beigelegten DVD). Durch Zusatz von LPS wurde der Zilienschlag weder negativ noch positiv in den Kontroll- bzw. Naphthalin-behandelten Tieren gegenüber den Tieren ohne LPS beeinflusst. Anschließendes Hinzufügen von ATP konnte die Zilienschlagfrequenz jedoch nicht erhöhen.

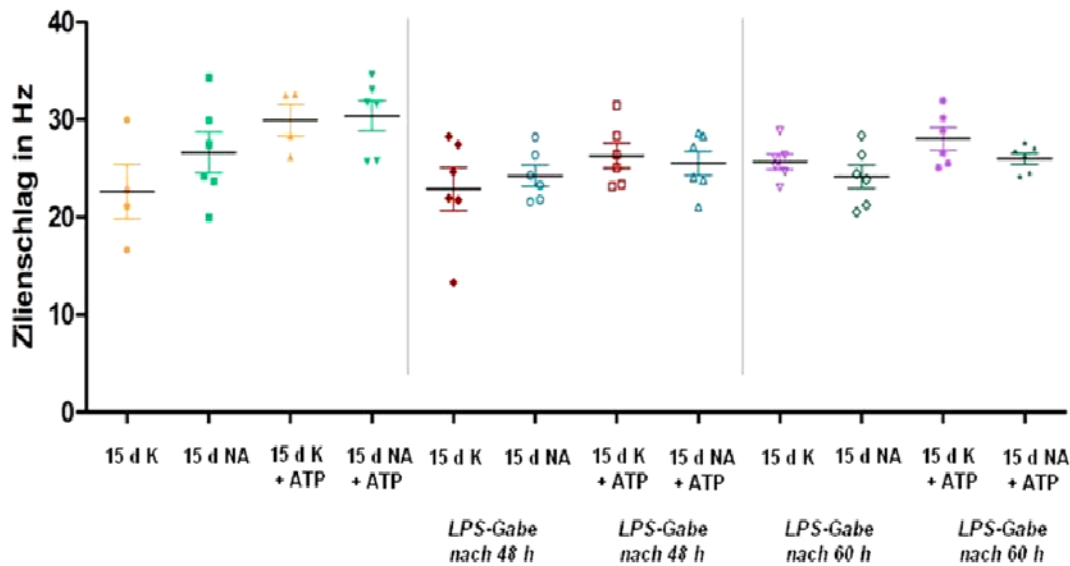


Abbildung 36 Zilienschlag in Hz 15 d nach Vehikel (K)- und Naphthalin (NA)-Gabe ohne und mit LPS nach 48 h bzw. nach 60 h. Ein Datenpunkt zeigt die Messung des Zilienschlags aus einer Mastrachea. Dabei wurden 5 bis 8 Epithelareale untersucht und davon der mittlere Zilienschlag berechnet. Es werden jeweils die Mittelwerte mit dem Standardfehler angegeben. 2 bis 3 Experimente mit jeweils 2 Mäusen (n=4-6). Mann-Whitney Test nicht signifikant.

Verminderter Partikeltransport an Tag 15 nach Naphthalin-Gabe mit einmaliger LPS-Gabe

Es werden im Text jeweils die MW in Mikrometer/Sekunde ($\mu\text{m/s}$) für den Partikeltransport angegeben. Für die Berechnung der mittleren Geschwindigkeit der Partikel für eine Trachea wurden fünf Bereiche aufgenommen und die mittlere Transportgeschwindigkeit dieses Bereichs berechnet. Anschließend erfolgte eine Berechnung des Mittelwerts, der aus den fünf Bereichen ermittelt wurde.

Die mittlere zilienvermittelte Transportgeschwindigkeit (Abbildung 37) der 15 d Kontroll-Tiere betrug $61,67 \mu\text{m/s}$. Die Transportgeschwindigkeit war nach ATP-Zugabe nicht signifikant verändert ($76,86 \mu\text{m/s}$). Dagegen betrug die mittlere Transportgeschwindigkeit der 15 d Naphthalin-behandelten Tiere $48,94 \mu\text{m/s}$. Zugabe von ATP führte nicht zu einer signifikant erhöhten Transportgeschwindigkeit ($64,15 \mu\text{m/s}$).

Das zilentragende Epithel der 15 d Kontroll-Tiere, die nach 48 h LPS erhalten haben, transportierte Partikel mit einer mittleren Geschwindigkeit von $46,18 \mu\text{m/s}$ (siehe Film 12 auf der beigelegten DVD). Nach Zugabe von ATP war diese nicht signifikant verringert ($41,87 \mu\text{m/s}$). Die mittlere Partikelgeschwindigkeit der 15 d Naphthalin-behandelten Tieren, die LPS nach 48 h erhalten haben, betrug $37,09 \mu\text{m/s}$. Durch Zugabe von ATP wurde die Geschwindigkeit nicht signifikant erhöht ($39,66 \mu\text{m/s}$).

Die mittlere Transportgeschwindigkeit der 15 d Kontroll-Tiere, die nach 60 h LPS erhalten haben, betrug $58,54 \mu\text{m/s}$. Durch Zugabe von ATP war diese nicht signifikant $66,49 \mu\text{m/s}$ erhöht. Während eine deutlich langsamere Partikelgeschwindigkeit in den 15 d Naphthalin-behandelten Tieren, die nach 60 h LPS erhalten haben, verzeichnet wurde ($21,76 \mu\text{m/s}$). Die Transportgeschwindigkeit war nach ATP-Gabe nicht signifikant erhöht ($25,96 \mu\text{m/s}$). Es konnte bei den Tieren, die nach 60 h LPS bekommen haben, ein signifikanter Geschwindigkeitsabfalls der Naphthalin-behandelten Tiere gegenüber den Kontroll-Tieren ohne und mit ATP beobachtet werden.

In den 15 d Naphthalin-behandelten Tieren war die mittlere Transportgeschwindigkeit im Vergleich zu ihren Kontrollen wieder normal. Erhielten Naphthalin behandelte Tiere allerdings zusätzlich nach 60 h LPS, so verschlechterte sich die mittlere Transportgeschwindigkeit gegenüber den Kontrollen rapide.

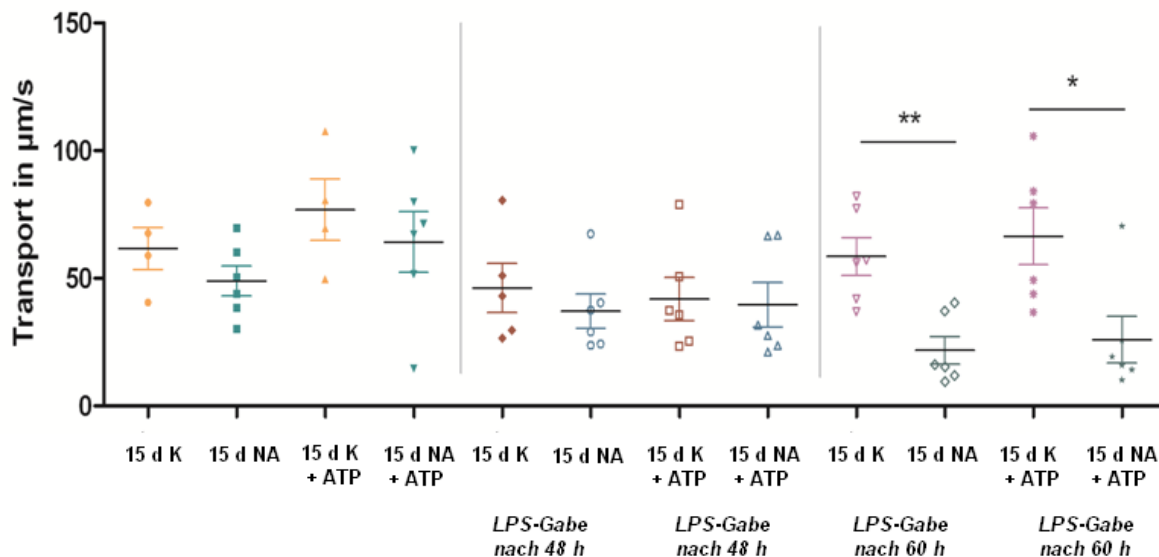


Abbildung 37 Partikeltransport in $\mu\text{m/s}$ im Trachealepithel 15 d nach Vehikel (K)- und Naphthalin (NA)-Gabe ohne und mit LPS nach 48 h bzw. nach 60h. Ein Datenpunkt zeigt die Messung des Partikeltransportes aus einer Maustrachea. Dabei wurden fünf Epithelareale untersucht und davon der mittlere Partikeltransport berechnet. Es werden jeweils die Mittelwerte mit dem Standardfehler angegeben. 2 bis 3 Experimente mit jeweils 2 Mäusen ($n=4-6$). Mann-Whitney Test. $P < 0,05$ (*). $P < 0,01$ (**).

4.6 Gestörte epitheliale Ausrichtung im regenerierten Trachealepithel der Maus

Während der Transportuntersuchungen wurde eine gestörte epitheliale Ausrichtung beobachtet. Dabei wurden sich auf dem Trachealepithel befindende Partikel 15 d nach Naphthalin-Gabe mit LPS-Gabe in unterschiedliche Richtungen transportiert (Abbildung 38). Es wird von den 15 d Kontroll-Tieren mit LPS-Intervention sowie von den 15 d Naphthalin-behandelten Tieren ohne und mit zusätzlicher LPS-Intervention jeweils ein Bild aus drei verschiedenen Filmen unterschiedlicher Tiere der Partikeltransport aufgeführt. Die einzelnen Farben stellen dabei die einzelnen Partikel und ihre Bewegungsrichtung im zilienträgenden Trachealepithel dar.

In den 15 d Kontroll-Tracheen mit zusätzlicher LPS-Intervention wurden Partikel in eine Richtung transportiert (Abbildung 38A).

Für die 15 d Naphthalin-behandelten Tiere ohne LPS wurde in insgesamt einer von sechs Tracheen Wirbel beobachtet (4 aus 30 aufgenommenen Filmen) (Abbildung 38B).

Für die Naphthalin-behandelten Tiere, die nach 48 h mit LPS interveniert wurden, wurden in drei von sechs Tracheen (10 von 30 aufgenommenen Filmen) Auffälligkeiten in der Partikelrichtung beobachtet (Abbildung 38C).

Für die Naphthalin-behandelten Tiere, die nach 60 h mit LPS interveniert wurden, wurden in zwei von sechs Tracheen (5 von 30 aufgenommenen Filmen) ebenfalls unterschiedliche Richtungen der Partikel beobachtet (Abbildung 38D).

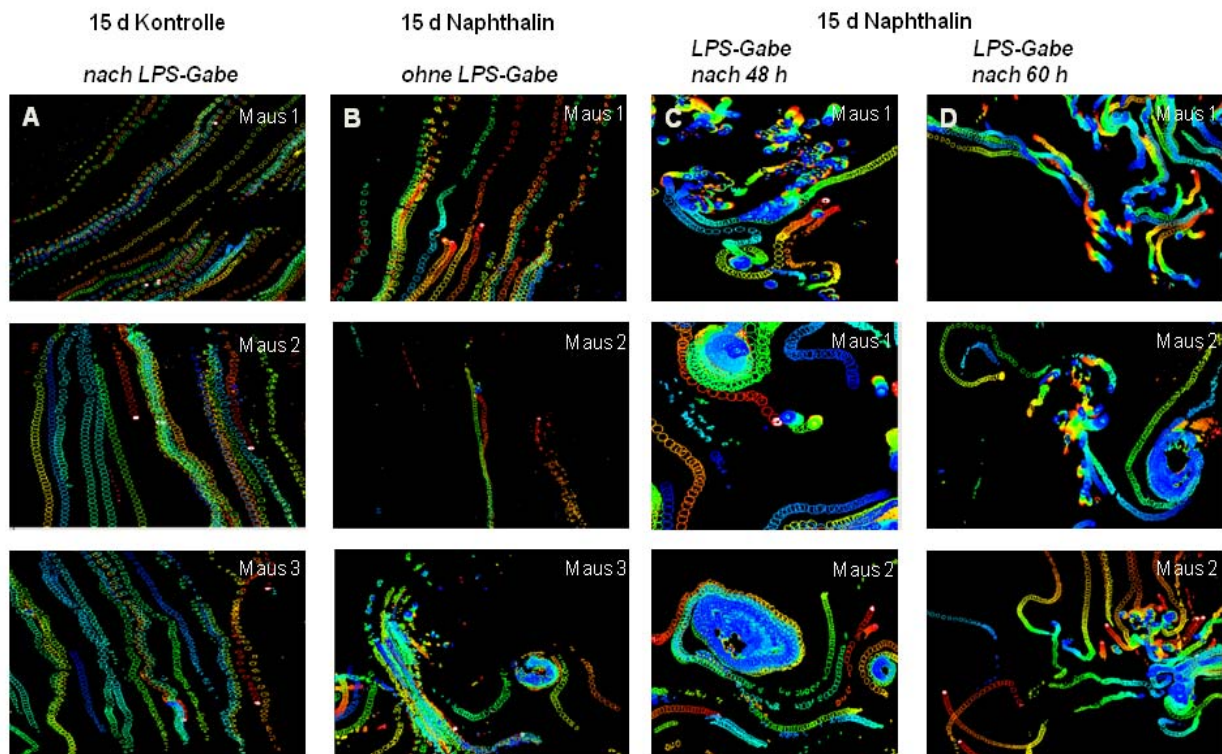


Abbildung 38 Zilienvermittelter Partikeltransport im Trachealepithel der Maus. Es werden jeweils drei Einzelbilddaufnahmen aus einem Film für den Partikeltransport gezeigt. Die bunten Kreise (eine Farbe steht für einen Partikel) stellen die Geschwindigkeit der einzelnen Partikel auf dem Epithel der Trachea dar. Je näher ein farbiger Kreis sich hintereinander befindet, umso schneller bewegte sich der Partikel auf dem Epithel. A) Partikelbewegung in eine Richtung aus drei Kontrolltracheen mit LPS-Gabe (pro Film eine Trachea dargestellt). B) Partikelbewegung in eine Richtung sowie im Wirbel aus drei aufgenommenen Filmen von drei 15 d Naphthalin-Tracheen ohne LPS-Gabe. C) Partikelbewegung in unterschiedliche Richtungen sowie im Wirbel aus drei aufgenommenen Filmen von zwei 15 d Naphthalin-Tracheen mit LPS-Gabe nach 48 h. D) Partikelbewegung in unterschiedliche Richtungen sowie im Wirbel aus drei aufgenommenen Filmen von zwei 15 d Naphthalin-Tracheen mit LPS-Gabe nach 60 h.

Aufgrund einer Störung in der Orientierung zilentragender Zellen, wurden also mehrfach Wirbel im Trachealepithel der Maus beobachtet (Abbildung 39, siehe Film 13 und 14 auf der beigelegten DVD)). Diese Wirbel entstanden vermehrt in Tracheen, die nach Naphthalin-Gabe zusätzlich mit LPS behandelt wurden.

In den Kontrollen waren nach 15 d keine Wirbel im Trachealepithel vorhanden. Hatten die Tiere jedoch Naphthalin erhalten, so wurde ein Wirbel im Trachealepithel nach 15 d beobachtet. Bei zusätzlicher Behandlung mit LPS waren sogar mehrere Naphthalin-behandelte Tiere mit Wirbel im Trachealepithel zu verzeichnen (Abbildung 40).

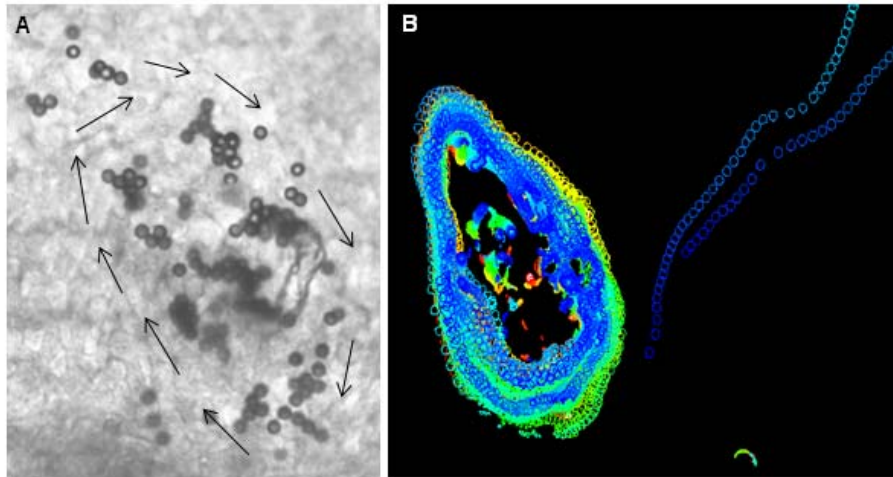


Abbildung 39 Wirbel im Trachealepithel der Naphthalin und LPS behandelten Maus nach 15 d. A) Aufnahme der transportierten Partikel. Die Pfeile geben die Richtung der transportierten Partikel an. B) Aufnahme von der Auswertung der Partikelgeschwindigkeit. Die bunten Kreise (eine Farbe steht für einen Partikel) stellen die Geschwindigkeit der einzelnen Partikel auf dem Trachealepithel dar. Je näher ein farbiger Kreis sich hintereinander befindet, umso langsamer bewegte sich der Partikel auf dem Epithel.

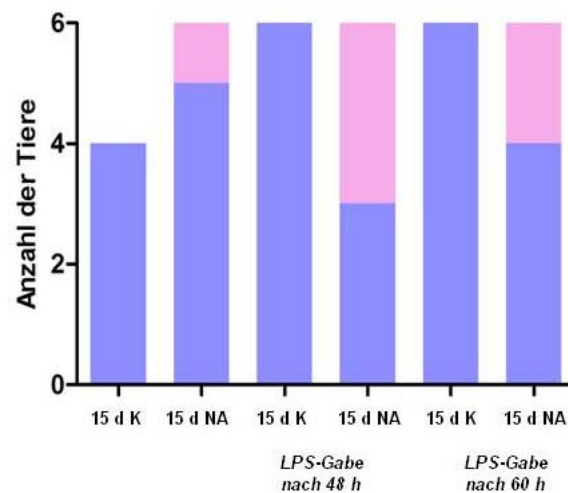


Abbildung 40 Anzahl der Tiere, die im Transport untersucht wurden und Wirbel im Trachealepithel nach Naphthalin-Gabe (NA) ohne und mit Intervention von LPS auswiesen. Keine Wirbel (lila), Wirbel (rosa, 15 d NA: n=1; 15 d NA mit LPS-Gabe 48 h nach NA-Gabe: n=3; 15 d NA mit LPS-Gabe 60 h nach NA-Gabe: n=2). K = Kontrolle

4.7 Zellverteilung im Trachealepithel der Maus nach der Regeneration

Ähnliche Verteilung von nicht-zilientragenden, zilientragenden und Basalzellen nach der Regeneration des Trachealepithels ohne und mit LPS-Intervention

Die 15 d Kontroll- (jeweils 6 Tiere) und Naphthalin-behandelten Tiere (jeweils 6 Tiere) wurden ohne und mit LPS auf die Anzahl ihrer Trachealepithelzellen analysiert (Abbildung 41 und 42).

Aufgrund der verringerten Transportgeschwindigkeit in den 15 d Naphthalin-behandelten Tieren mit zusätzlicher LPS Behandlung wurden die Trachealepithelzellen auf ihre prozentuale Verteilung zwischen den Knorpelspangen (Bandbereich) und über den Knorpelspangen (Knorpelbereich) untersucht.

Dabei wurde eine geringfügige Verschiebung der Anzahl der Basalzellen zu nicht-zilientragenden Zellen im Trachealepithel über dem Bandbereich und dem Knorpelbereich zwischen Kontroll- und Naphthalin-behandelten Tieren beobachtet (Abbildung 41).

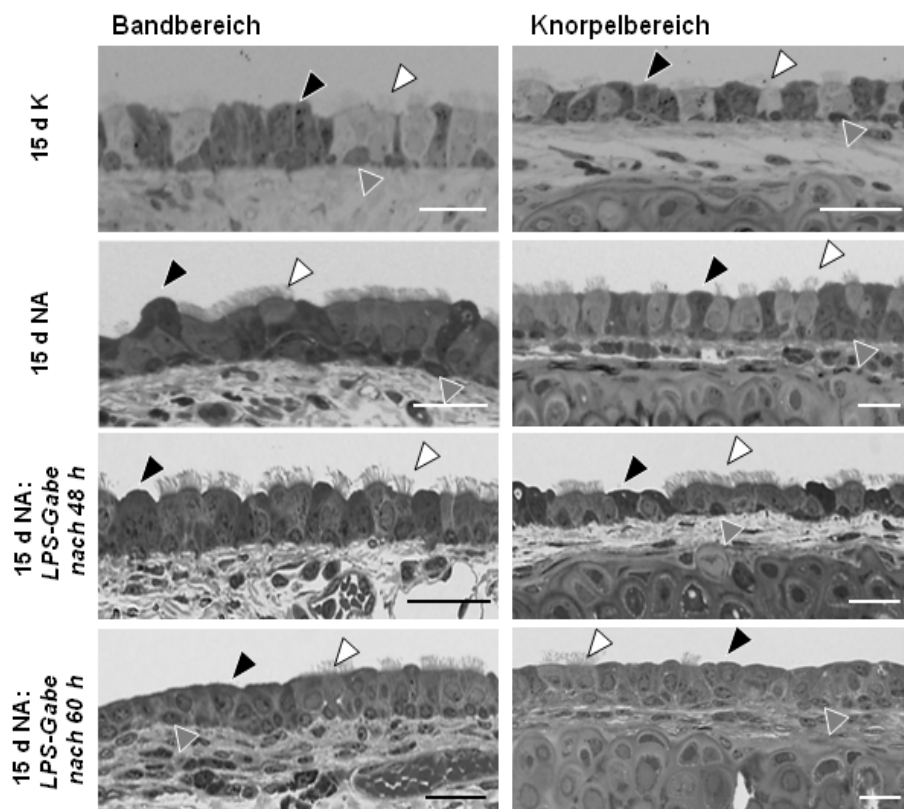


Abbildung 41 Trachealepithelzellen über dem Band- und dem Knorpelbereich. Epithelzellen der Trachea einer Kontrolle (K) nach 15 d, 15 d nach Naphthalin-Gabe (NA) sowie 15 d nach Naphthalin-Gabe mit LPS-Gabe nach 48 h bzw. nach 60 h. Nicht-zilientragende Zellen (schwarze Pfeilspitze), zilientragende Zellen (weiße Pfeilspitzen), Basalzellen (graue Pfeilspitze). Maßstab entspricht 20 µm.

Es wurden keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der Epithelzellen über dem Bandbereich zwischen Kontroll- und Naphthalin-behandelten Tieren festgestellt (Abbildung 42). Es kam lediglich zu geringfügigen Verschiebungen zwischen Basal- und nicht-zilientragenden Zellen. Die Basalzellen in den Naphthalin-behandelten Tieren, die nach 60 h LPS erhalten haben, waren im Vergleich zur Kontrolle und allen anderen Zeitpunkten am höchsten.

Über dem Knorpel gab es nach der Regeneration ebenfalls keine signifikante Veränderung in der Zellverteilung zwischen den Kontrollen und den Naphthalin-behandelten Tieren. Hier wurden ebenfalls geringe Verschiebungen zwischen Basal- und nicht-zilientragenden Zellen beobachtet.

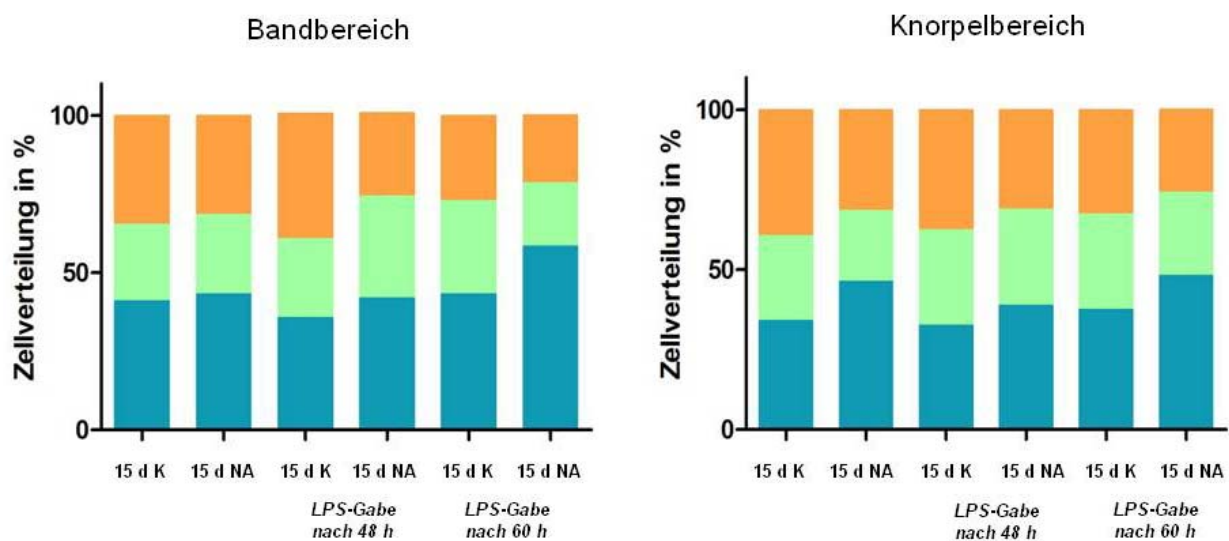


Abbildung 42 Zellverteilung der Trachealepithelzellen über dem Bandbereich und dem Knorpelbereich im Trachealepithel nach 15 d von jeweils 6 Tieren pro Zeitpunkt. Basalzellen (blau), zilientragende Zellen (grün), nicht-zilientragende Zellen (orange). K = Kontrolle, NA = Naphthalin

Insgesamt nahmen die Basalzellen nach der Regeneration über dem Band und dem Knorpel im Trachealepithel der Maus zu und die nicht-zilientragenden Zellen ab, während die zilientragenden Zellen gegenüber den Kontrollen gleich blieben. Das Verhältnis zilientragender zu nicht-zilientragender Zellen hat sich weder über dem Band- noch über dem Knorpelbereich verändert.

Vermehrtes Vorkommen kurzer Zilien im Trachealepithel 15 d nach Naphthalin-Gabe, wenn nach 60 h mit LPS interveniert wurde

Aufgrund des rapiden Transportabfalls in den 15 d Naphthalin-behandelten Tieren, die nach 60 h mit LPS interveniert wurden, und keiner signifikanten Veränderung in der Zellverteilung wurden die Tracheen in den REM-Untersuchungen zusätzlich auf das Flächenverhältnis kurzer und normal langer Zilien zilienträger Zellen untersucht (Abbildung 43).

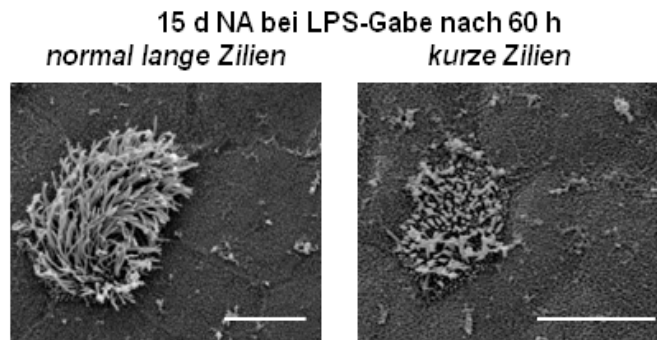


Abbildung 43 kurze und normal lange Zilien zilienträger Zellen im Trachealepithel der Maus 15 d nach Naphthalin (NA)-Gabe, wenn nach 60 h LPS verabreicht wurde. Maßstab entspricht 10 µm.

In den Naphthalin-behandelten Tieren wurden 16% kurze Zilien und 84% normal lange Zilien in den ausgemessenen Flächen zilienträger Zellen ermittelt (siehe auch Film 11 auf der beigelegten DVD). Dagegen wurden nur 2% kurze Zilien und 98% normal lange Zilien in den ausgemessenen Bereichen zilienträger Zellen der Kontroll-Tiere ermittelt (Abbildung 44). Die Gesamtverteilung der Fläche zilienträger zu nicht-zilienträger Zellen betrug in den Kontrollen 33% zu 66% und in den Naphthalin-behandelten Tieren 30% zu 70%. Die Verteilung ist also nahezu gleich.

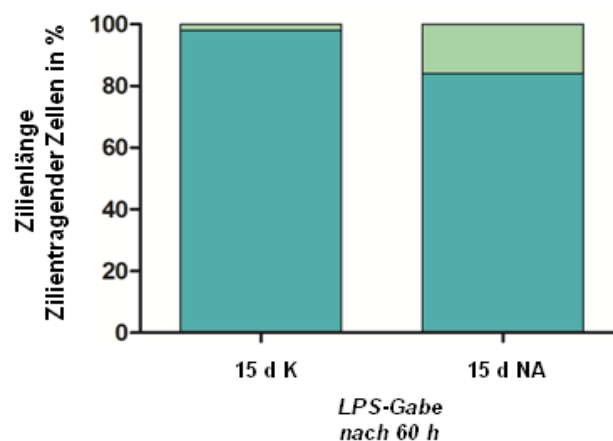


Abbildung 44 Verteilung kurzer und normal langer Zilien zilienträger Zellen im Trachealepithel der Maus nach 15 d, wenn nach 60 h mit LPS interveniert wurde. Kurze Zilien (grün), normal lange Zilien (blau). K = Kontrolle, NA = Naphthalin

5 Diskussion

Ein Ziel der Arbeit war, den Zeitverlauf der Naphthalin-vermittelten Schädigung und nachfolgenden Regeneration des Trachealepithels zu beschreiben, um geeignete Zeitpunkte für eine Intervention mit LPS zu definieren, bei denen primär die Proliferationsphase beziehungsweise die Differenzierungsphase beeinflusst wird.

Aus meinen Ergebnissen geht hervor, dass binnen 48 h nach Naphthalin-Gabe alle nicht-zilientragenden und zilientragenden Zellen das Trachealepithel verlassen haben und nur die Basalzellen die Basalmembran bedeckten. Der Verlust nicht-zilientragender und zilientragender Zellen spiegelte sich ebenfalls in einer Abnahme der mRNA-Expression von CC10 (für die nicht-zilientragenden Zellen) und FoxJ1 (für die zilientragenden Zellen) wieder. Mit Zunahme und Morphologieveränderung der Basalzellen sowie der gesteigerten Zellproliferation war bereits nach 72 h ein erster neuer Epithelverband mit kurzen Zilien vorhanden. Mit Zunahme der mRNA-Expression von CC10 ab 5 d nach Naphthalin-Gabe wurden ebenfalls erste nicht-zilientragende Zellen immunhistochemisch wieder nachgewiesen. Die Zellproliferation hat ab diesem Zeitpunkt stark abgenommen. 15 d nach Naphthalin-Gabe war das Trachealepithel wieder vollständig regeneriert. Das zilientragende Epithel konnte außerdem Partikel wieder ordnungsgemäß abtransportieren. Aufgrund dessen, dass nach 48 h nur noch Basalzellen auf dem Trachealepithel vorhanden waren und die Zellproliferation aktiv war, wurde dieser Zeitpunkt gewählt (48 h: Proliferation). Der zweite Zeitpunkt wurde mit 60 h nach Naphthalin-Gabe ausgewählt, denn dies war der früheste Zeitpunkt der beginnenden Differenzierung (60 h: Differenzierung).

Anschließend wurde untersucht, wie sich eine einmalige LPS-Gabe auf die frühe Regeneration (von 48 h bzw. 60 h bis 4 d nach Naphthalin-Gabe) des Trachealepithels auswirkt.

Wenn 48 h nach Naphthalin-Gabe LPS verabreicht wurde, so waren 4 d nach Naphthalin-Gabe keine regenerierten Epithelzellen, sondern ein zerstörter Epithelverband und nur Basalzellen vorhanden. Wurde 60 h nach Naphthalin-Gabe LPS verabreicht, war 4 d nach Naphthalin-Gabe ein nahezu geschlossener Epithelverband vorhanden. Hier konnte im Gegensatz zu Tracheen ohne LPS-Gabe immunhistochemisch CC10 nachgewiesen werden. Dagegen wurde 4 d nach Naphthalin-Gabe, egal zu welchem Zeitpunkt LPS verabreicht wurde (48 h oder 60 h), ein Proliferationsstopp in den Epithelzellen beobachtet.

15 d nach Naphthalin-Gabe, egal wann LPS verabreicht wurde (48 h oder 60 h), war das Epithel wieder regeneriert. Während sich die Anzahl der nicht-zilientragenden und der Basalzellen in den Naphthalin-behandelten Tieren geringfügig im Vergleich zu den Kontrollen verschob, blieb die Anzahl zilientragender Zellen jedoch gleich. Allerdings war die Transportgeschwindigkeit in den Tieren, die 60 h nach Naphthalin-Gabe LPS verabreicht

bekommen haben, vermindert. Dagegen war der Transport in den Tieren, die nach 48 h LPS erhalten haben, im Vergleich zu den Kontrollen normal. In Tieren, denen während der Regeneration des Trachealepithels LPS verabreicht wurde, wurden vermehrt Störungen in der epithelialen Ausrichtung der zilientragenden Zellen beobachtet.

5.1 Eignung des Naphthalinmodells zur Untersuchung der Regeneration des Trachealepithels der Maus

Bisher war bekannt, dass Naphthalin in den kleinen Atemwegen die Clara-Zellen (nicht-zilientragende Zellen) selektiv schädigen kann (Stripp et al., 1995; Van Winkle et al., 2002; Park et al., 2006; Yildirim et al., 2008; Oliver et al., 2009). 2007 berichteten Rawlins und Autoren, dass Naphthalin in der Trachea ebenfalls eine Epithelschädigung bewirkt. Es wurde jedoch kein zeitlicher Verlauf der Schädigung untersucht. Durch Untersuchungen von Cole und Kollegen (2010) wurde bestätigt, dass Naphthalin das Trachealepithel *in vivo* schädigt und 3 d nach Schädigung nur noch Basalzellen auf der Basalmembran vorhanden sind. Aufgrund der Daten von Cole et al. war aber unklar, wann die Ablösung der Epithelzellen beginnt und ab wann erste neue Epithelzellen wieder erschienen. Die Autoren gaben lediglich Auskunft darüber, dass 6 d nach Naphthalin-Applikation erste nicht-zilientragende sowie zilientragende Zellen wieder nachweisbar waren.

Meine Untersuchungen bestätigten eine Schädigung des Trachealepithels der Maus nach Naphthalin-Applikation. *In vivo* lösten sich bereits innerhalb von 48 h nach Naphthalin-Gabe neben den nicht-zilientragenden Zellen ebenso die zilientragenden Zellen vom Epithel ab (Abb. 10). Das Ablösen der zilientragenden Zellen in der Trachea wurde auch von Cole et al. berichtet und wird in den kleinen Atemwegen nicht beobachtet. Unklar war bisher, warum die zilientragenden Zellen in der Trachea auch zugrunde gehen. Durch zusätzliche *ex vivo*-Untersuchungen konnte ich zeigen, dass sich nach Naphthalin-Gabe innerhalb von zwei bis vier Stunden nicht-zilientragende Zellen vom Epithel der Trachea gelöst haben, während die zilientragenden Zellen jedoch verbleiben, sich zusammendrängten und kleine „Pakete“ bildeten (Abb. 5).

Daher legen meine Daten nahe, dass die zilientragenden Zellen nicht direkt durch Naphthalin geschädigt werden, sondern durch den Verlust der nicht-zilientragenden Zellen ihren Halt im Epithel verlieren.

Eine Schädigung der nicht-zilientragenden Zellen durch Naphthalin tritt auf, wenn Naphthalin an das Cytochrom P₄₅₀ 2F2 Isoenzym (CYP2F2) bindet, das sich in den nicht-zilientragenden Zellen befindet. Dadurch wird Naphthalin in 1R,2S-Naphthalinoxid katalysiert (Buckpitt et al., 1995; Fanucchi et al., 1997). Die Zellen werden metabolisch gestresst, vakuolisieren und verlassen das Epithel (Van Winkle et al., 1997). Es ist anzunehmen, dass in einer gesunden

Trachea eine hohe Expression von CYP2F2 und CC10 in den nicht-zilientragenden Zellen vorhanden ist. Wird die CYP2F2-Expression nach Naphthalin-Gabe also herabgesetzt, scheint dies den Verlust nicht-zilientragender Zellen in den Bronchioli widerzuspiegeln (Yildirim et al., 2008). Hinzu kommt eine Verminderung der CC10-Expression mit dem Verlust nicht-zilientragender Zellen.

Meine *in vivo*-Daten zeigen, dass im Trachealepithel eine Schädigung durch Naphthalin stattgefunden hat. In der Histologie wurden diese Epithelschäden durch den Verlust zilientragender und nicht-zilientragender Zellen beobachtet (Abb. 8 bis 10). Außerdem konnte diese auf mRNA-Ebene durch eine verminderte CC10- sowie CYP2F2-Expression in den Naphthalin behandelten Tieren im Vergleich zu den dazugehörigen Kontrollen über den Zeitraum 60 h (2,5 d) bis 4 d (Abb. 18 und 19) gezeigt werden.

Bei den histologischen Untersuchungen der Tracheen und Lungen ist jedoch auch aufgefallen, dass einige Tiere kein geschädigtes Epithel nach Naphthalin-Gabe aufwiesen. Die Tiere zeigten also entweder eine individuell unterschiedliche Reaktion auf Naphthalin oder es lag ein methodischer Fehler vor.

Aufgrund dieser Problematik wurden die Lungen, deren Reaktion auf Naphthalin in der Literatur hinlänglich beschrieben ist (Van Winkle et al., 2002; Yildirim et al., 2008), als interne Kontrollen verwendet. Waren also nicht-zilientragende Zellen aus dem Epithel der Lunge abgelöst und zilientragende Zellen auf der Basalmembran abgeplattet, so wurden die dazugehörigen Tracheen in die Auswertung einbezogen. Von den, für die histologischen Untersuchungen mit Naphthalin behandelten und überlebenden Tieren (152 Tiere) zeigten 82% eine Schädigung des Atemwegsepithels in der Lunge und in der Trachea. In den Tieren, deren Lungen nicht betroffen waren, entsprach auch das Trachealepithel vom Aussehen her einer Kontrolle.

Leider standen bei den qRT-PCR sowie den Transport-Versuchen keine Lungen zur Verfügung bei denen die erfolgreiche Schädigung des Atemwegsepithels verifiziert werden konnte. Deswegen konnte hier keine Aussage über sogenannte „non-responder“ getroffen werden. Da in den histologischen Untersuchungen jedes 5,6. Tier (circa 18%) ein „non-responder“ war, ist davon auszugehen, dass von den restlichen überlebenden Tieren (qRT-PCR und Transport, insgesamt 67 Tiere) ebenfalls jedes 5,6. Tier ein „non-responder“ sein könnte. Das heißt, dass circa 18% (circa 12 Tiere) nicht auf Naphthalin angesprochen haben könnten.

Naphthalin-behandelte Tiere, die eine hohe mRNA-Expression von CC10 aufwiesen, zeigten ebenfalls hohe mRNA-Expressionen in CYP2F2 und FoxJ1. Dies weist darauf hin, dass die nicht-zilientragenden Zellen in diesen Tieren nicht geschädigt wurden. Diese Tiere waren daher höchstwahrscheinlich „non-responder“. Da die „non-responder“ aber nicht zweifelsfrei

identifiziert werden konnten, wurden für die statistische Auswertung jedoch alle Tiere der qRT-PCR-Versuche und der Transportversuche in die Auswertung einbezogen.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, warum „non-responder“ aufgetreten sind. Diese können sein: ein Mangel im CYP2F2 Isoenzym im Atemwegsepithel, unterschiedliche Empfindlichkeit der verwendeten Tierstämme, ein methodischer Fehler oder eine unbekannt Komponente.

1992 zeigten Buckpitt und Kollegen, dass Zellen imstande sind die Naphthalin-Toxizität zu überleben. Diskutiert wurde dort ein Mangel im CYP2F2 Isoenzym als mögliche Ursache.

Meine qRT-PCR-Untersuchungen sprechen gegen einen Mangel an CYP2F2 Isoenzym als mögliche Ursache. Denn CYP2F2 mRNA war im Vergleich zur Expression von CC10 und FoxJ1 sehr ähnlich. Es war kein Naphthalin-behandeltes Tier vorhanden, das eine hohe Expression von CC10 und eine niedrige Expression von CYP2F2 aufwies.

Die unterschiedliche Reaktion der Tiere auf Naphthalin könnte daher auch am verwendeten Tierstamm liegen. Für die Naphthalin-Experimente verwendeten verschiedene Arbeitsgruppen unterschiedliche Tierstämme, wie FVB/n-Mäuse (Stripp et al., 1995; Reynolds et al., 2000; Park et al., 2006; Cole et al., 2010), Swiss-Webster-Mäuse (Van Winkle et al., 1997; Van Winkle et al., 2002; Sutherland et al., 2011) oder C57BL/6-Mäuse (Rawlins et al., 2006; Yildirim et al., 2008; Oliver et al., 2008). Außerdem wurden unterschiedliche Mengen (200 mg/kg, 250 mg/kg, 275 mg/kg oder 300 mg/kg Mausgewicht) von Naphthalin appliziert. Jede Arbeitsgruppe beobachtete nach Naphthalin-Gabe eine andere Sensitivität im Atemwegsepithel. Beispielsweise wurden unterschiedliche Zeiträume der Proliferation publiziert (siehe Diskussion 5.2.1).

Für meine Untersuchungen wurden männliche C57BL/6-Mäuse herangezogen. Andere Arbeitsgruppen wie Rawlins et al., 2007 (Maus-Geschlecht unbekannt); Yildirim et al., 2008 (männliche Mäuse) oder Oliver et al., 2009 (männliche oder weibliche Mäuse) benutzten ebenfalls C57BL/6-Mäuse für die Naphthalin-Experimente. Hier wurde jedoch nicht angegeben, ob „non-responder“ während der Untersuchungen aufgetreten sind. Die Arbeitsgruppe um Yildirim (*persönlich nachgefragt*) beobachtete in ihren männlichen C57BL/6-Mäusen lediglich unterschiedliche Schädigungsgrade des Clarazellverlustes nach Naphthalin-Gabe.

Da bereits andere Arbeitsgruppen mit C57BL/6-Mäusen erfolgreich gearbeitet haben und keine „non-responder“ beobachtet wurden, ist es unwahrscheinlich, dass der von mir verwendete Tierstamm die Ursache für die „non-responder“ ist.

Da weder ein Mangel im CYP2F2 Isoenzym noch der Tierstamm als mögliche Ursachen für „non-responder“ in Frage kommen, könnte ein methodischer Fehler als möglicher Grund vorliegen.

Ein methodischer Fehler ist aufgrund der Durchführung meiner Naphthalin-Experimente

allerdings unwahrscheinlich. Zunächst verliefen alle Versuche über mehrere Wochen, so dass demnach mehrere Tierbestellungen erforderlich waren. Dabei wurden jeweils nur so viele Tiere beim Züchter bestellt wie ich für mein geplantes Experiment benötigt habe. Für die Experimente wurden die Tiere immer in gleichen Gruppen von je 6 Tieren in einem Käfig gehalten (für die Naphthalin- sowie die Kontroll-Tiere). Außerdem wurden nicht alle Tiere für alle Zeitpunkte an einem Tag mit Naphthalin behandelt, sondern pro Tag jeweils 6 Tiere für einen einzelnen Zeitpunkt. Davon wurden je 2 Tiere für eine Methode verwendet (2 Tiere für REM, 2 Tiere für IHC und 2 Tiere für qRT-PCR). Vor jeder Behandlung mit Naphthalin wurde die benötigte Menge an Naphthalin immer frisch in Maiskeimöl angesetzt und Naphthalin vollständig in die Maus injiziert. Außerdem wurden keine Totalausfälle eines Versuchstages beobachtet, so dass hier davon ausgegangen werden kann, dass Naphthalin gewirkt haben sollte.

Sollte also kein weiterer methodischer Fehler vorliegen, so bleibt nur noch die Vermutung, dass andere Faktoren dazu geführt haben, dass nicht alle Tiere auf die Gaben von Naphthalin reagiert haben. Da bei den „non-respondern“ sowohl in der Trachea als auch in der Lunge keine Reaktion auf Naphthalin zu beobachten war, kann davon ausgegangen werden, dass Naphthalin vergleichbar gut geeignet ist, das Epithel der Trachea sowie das Epithel der intrapulmonalen Atemwege zu schädigen.

5.2 Regenerationsablauf des Epithels nach Naphthalin-Gabe in intrapulmonalen Atemwegen verglichen mit der Trachea

5.2.1 Gemeinsamkeiten bei der Regeneration des Epithels der Trachea und der intrapulmonalen Atemwege

Durch Naphthalin werden im Atemwegsepithel der intrapulmonalen Atemwege die Clarazellen selektiv geschädigt (Stripp et al., 1995; Van Winkle et al., 2002; Park et al., 2006; Rawlins et al., 2007; Yildirim et al., 2008; Oliver et al., 2009). 2010 zeigten Cole und Kollegen, dass im Trachealepithel die nicht-zilientragenden Zellen ebenfalls durch Naphthalin zerstört werden, was durch meine Daten bestätigt wird. In Lunge und Trachea waren erste Zellverluste nicht-zilientragender Zellen bereits nach 12 h zu beobachten (Abb. 8).

In den intrapulmonalen Atemwegen wird die aktive Phase der Proliferation des Atemwegsepithels in der Literatur unterschiedlich beschrieben. 1997 zeigten Van Winkle und Kollegen, dass die Proliferation 24 h bis 48 h nach der Schädigung stattfindet. Während 2006 Park und Kollegen beschrieben, dass die Proliferation 48 h bis 96 h nach Schädigung

abläuft. 2007 demonstrierten Rawlins und Kollegen, dass die Proliferation 52 h bis 72 h nach Schädigung mit Naphthalin am stärksten ist. Obwohl jede Autorengruppe leicht unterschiedliche Zeiträume der maximalen Proliferation nach Naphthalinschädigung angibt, war der Zeitrahmen für die Proliferation in den intrapulmonalen Atemwegen ähnlich (24 h bis 96 h). Für das Trachealepithel zeigten Cole und Kollegen (2010), dass die Proliferation im Zeitraum von 3 d bis 6 d nach Naphthalin-Gabe stattfindet.

Meine Untersuchungen ergaben, dass die Phase der Proliferation in der Trachea bereits nach 1 d begonnen hatte und 5 d nach Naphthalin-Gabe beendet war (Abb. 23).

Durch meine frühen Untersuchungszeitpunkte konnte ich im Gegensatz zu Cole et al. (2010) zeigen, dass bereits während des Ablösens des Atemwegsepithels eine Zellproliferation im Trachealepithel stattfindet. Im Gegensatz zu Cole et al. (2010) zeigen meine Daten auch, dass die Zellproliferation bereits 5 d nach Naphthalin-Gabe abgeschlossen war.

Der Zeitraum der Zellproliferation des Atemwegsepithels verläuft in der Trachea und in der Lunge ähnlich, dauert in der Trachea jedoch länger als in den intrapulmonalen Atemwegen.

1997 demonstrierten Van Winkle und Kollegen, dass in den intrapulmonalen Atemwegen auf die Proliferationsphase die Differenzierungsphase folgt. Differenzieren sich nicht-zilientragende Zellen, so können diese auf immunhistologischer Ebene mittels Antikörper gegen das sekretorische Protein CC10 oder auf mRNA-Ebene aufgrund ihrer CC10-Expression nachgewiesen werden (Rawlins et al., 2007). Es wurde in den intrapulmonalen Atemwegen demonstriert, dass CC10-positive Zellen erst wieder nachgewiesen werden, wenn sekretorische Zellen beginnen zu differenzieren (Rawlins et al., 2007). 2006 beobachteten Park et al. in den intrapulmonalen Atemwegen erst 4 bis 7 Tage nach Naphthalinschädigung wieder schwach CC10-positive Zellen.

Für das Epithel der Trachea ist dies ähnlich. 2010 zeigten Cole und Kollegen, dass 3 d nach Naphthalin-Gabe noch keine CC10-positive Zellen zu beobachten sind, was mit einem geringen CC10 mRNA-Level einhergeht. Sobald erste CC10-positive Zellen nach 6 d beobachtet wurden, war auch eine Zunahme der CC10-Expression 6 d nach Naphthalin-Gabe zu verzeichnen (Cole et al., 2010).

Da meine Daten frühere Untersuchungszeitpunkte beinhalteten, konnte ich feststellen, dass die Expression von CC10 in einem Zeitraum von 60 h (2,5 d) bis einschließlich 4 d nach Naphthalin-Gabe gegenüber den Kontrollen vermindert war (Abb. 18). In diesem Zeitraum wurden noch keine CC10-positiven Zellen detektiert (Abb. 12 und 13). Erst als die CC10 mRNA-Expression ab 5 d nach Naphthalin-Gabe wieder anstieg, wurden erstmals wieder schwach markierte CC10-positive Zellen im Trachealepithel nachgewiesen (Abb. 14). Daher konnte ich die Daten von Cole et al. (2010) bestätigen, dass mit Zunahme der CC10-Expression im Epithel der Trachea ebenfalls wieder CC10-positive Zellen nachgewiesen werden können.

Der zeitliche Verlauf der Differenzierung der nicht-zilientragenden Zellen nach Naphthalin-Gabe ist im Trachealepithel verglichen mit den intrapulmonalen Atemwegen also ähnlich und der Nachweis von CC10-positiven Zellen ab 5 d nach Naphthalin-Gabe geht mit der steigenden mRNA-Expression von CC10 einher.

Eine vollständige Regeneration des intrapulmonalen Atemwegsepithels wurde 15 d nach Naphthalin-Gabe beobachtet (Van Winkle et al., 1997). 2006 detektierten Park und Kollegen 14 d nach Schädigung wieder Clarazellen (CC10-positive Zellen) sowie zilientragende Zellen (FoxJ1- und β -Tubulin-positive Zellen) in der Lunge.

Im Trachealepithel wurden von Cole und Kollegen (2010) CC10-positive und zilientragende Zellen 9 d und 13 d nach Naphthalin-Gabe beobachtet.

Meine Untersuchungen zeigten 15 d nach Naphthalin-Gabe ebenfalls ein vollständig regeneriertes Epithel mit nicht-zilientragenden und zilientragenden Zellen (Abb. 16). Neben den morphologischen Ergebnissen habe ich zusätzlich zeigen können, dass 15 d nach Naphthalin-Gabe der zilienvermittelte Transport des Trachealepithels wieder normal war (siehe Diskussion 5.2.3 sowie Abb. 26).

5.2.2 Unterschiede bei der Regeneration des Epithels der Trachea und der intrapulmonalen Atemwege

In den kleinen Atemwegen verbleiben die zilientragenden Zellen im Epithel, platten sich nach Naphthalin-Gabe ab und bedecken durch ihre Ausbreitung die Basalmembran (Van Winkle et al., 1997; Park et al., 2006). 2009 haben Oliver et al. gezeigt, dass 2 d nach Naphthalin-Gabe die nekrotischen Bronchiolarepithelzellen nicht FoxJ1-positiv waren, wobei die intakten und nicht durch Naphthalin geschädigten Zellen positiv für FoxJ1 (zilientragenden Zellen) waren.

Anders als in der Lunge, lösen sich in der Trachea nach Naphthalin-Gabe die zilientragenden Zellen von der Basalmembran ab (Abb. 8 bis 10). Dies wurde 2010 von Cole und Kollegen ebenfalls beobachtet. Die Arbeitsgruppe vermutete, dass die Ablösung der zilientragenden Zellen entweder durch Kontaktverlust der nicht-zilientragenden Zellen, durch den Naphthalin-Metabolismus in den zilientragenden Zellen oder durch Transfer toxischer Epoxide zustande gekommen ist.

Meine Daten haben gezeigt, dass der Verlust mit einer verminderten Expression von FoxJ1 nach Naphthalin-Gabe einhergeht (Abb. 20). Ähnliches wurde von Cole et al. (2010) gesehen. Um zu ermitteln aus welchem Grund die zilientragenden Zellen sich *in vivo* nach Naphthalin-Gabe ebenfalls ablösten, habe ich das Trachealepithel nach *ex vivo* Naphthalin-Gabe analysiert. Dabei stellte sich heraus, dass Naphthalin die nicht-zilientragenden Zellen *ex vivo* schädigt und die zilientragenden Zellen dicht zusammengedrängt auf der

Basalmembran verbleiben.

Meine *ex vivo*-Daten legen daher nahe, dass die zilientragenden Zellen ihren Halt im Epithel durch den Verlust der nicht-zilientragenden Zellen verlieren und sich deswegen von der Basalmembran ablösen.

Daraus kann geschlossen werden, dass Naphthalin im Trachealepithel ebenfalls die nicht-zilientragenden Zellen selektiv schädigt. Nur durch den Verlust der nicht-zilientragenden Zelle lösen sich die zilientragenden Zellen vom Trachealepithel.

Da in den intrapulmonalen Atemwegen keine Basalzellen vorkommen, erfolgt die Regeneration nach Naphthalin-Gabe aus den Clara-like Zellen. Denn die Bronchiolen besitzen ein sogenanntes multifunktionelles NEB-microenvironment (Hong et al., 2001), in dem sich die Clara-like Zellen befinden. Die Clara-like Zellen werden nicht durch Naphthalin geschädigt, da sie kein CYP2F2 Isoenzym besitzen, somit Naphthalin-resistent sind, aber CCSP exprimieren (Reynolds et al., 2000).

Das Trachealepithel besitzt dagegen Basalzellen (Hong et al., 2004; Rock et al., 2009; Cole et al., 2010). Die Basalzellen gelten als multipotente Progenitorzellen (Hong et al., 2004). Sie sind fähig das mit Naphthalin geschädigte intrapulmonale Bronchial- sowie das Trachealepithel zu erneuern (Hong et al., 2004; Hong et al., 2004). Cole und Kollegen (2010) zeigten, dass es zwei Subtypen (CK5+/15+ sowie CK5+/15+/14+) von Basalzellen im gesunden Trachealepithel gibt. Nach Naphthalin-Gabe exprimiert die Mehrheit der Basalzellen CK5. Außerdem besaßen 3 d nach Naphthalin-Gabe die CK14+ Basalzellen eine leichte quaderförmige und säulenartige Morphologie und eine hohe Proliferation, die bis 6 d nach Naphthalin-Gabe anhielt. Ab 6 d nach Naphthalin-Gabe gelangten die Basalzellen wieder in ihre ursprüngliche pyramidenartige Form.

In meinen Untersuchungen konnte ich zunächst zeigen, dass nach Naphthalin-Gabe nur noch Basalzellen auf der Basalmembran vorhanden waren (Abb. 10A und B) und konnte somit vorherige Daten unterstützen, dass Basalzellen die Progenitorzellen für die Regeneration des Epithels waren. Außerdem konnte ich die Daten von Cole et al. bestätigen, dass die Basalzellen während der Regeneration (2 d bis 4 d nach Naphthalin-Gabe) ihre Morphologie (von pyramidenförmig zu quaderförmig, säulenartig) und ihre Anzahl veränderten (Abb. 21). Außerdem blieb die Expression von CK5 über die Zeit der Schädigung und Regeneration nach Naphthalin-Gabe unverändert gegenüber den Kontrollen (Abb. 22). Währenddessen stieg die Zahl der proliferierenden Zellen parallel dazu an und verminderte sich ab 5 d nach Naphthalin-Gabe wieder (Abb. 23).

Meine Ergebnisse legen wie die vorhergehenden Untersuchungen nahe, dass die Basalzellen die Progenitorzellen im Trachealepithel und somit die proliferierenden Zellen sind. Es konnten jedoch keine immunhistochemischen Doppelmarkierungen für proliferierende und Basalzellen durchgeführt werden, weil beide Antikörper aus der gleichen

Tierspezies stammten und zusammen nicht anwendbar waren. Da allerdings die Basalzellen die einzigen vorhandenen Epithelzellen 48 h Naphthalin-Gabe waren, ist es sehr unwahrscheinlich, dass andere Zellen für die Proliferation verantwortlich sind. Ich konnte somit die Daten von Cole et al. (2010) zur Veränderung der Basalzellen in ihrer Morphologie sowie Anzahl, aufgrund ihrer Proliferation, und der mRNA-Expression von CK5 nach Naphthalin-Gabe bestätigen.

Eine schematische Zusammenfassung der Auswirkungen von Naphthalin im Trachealepithel ist in der Abbildung 45 dargestellt.

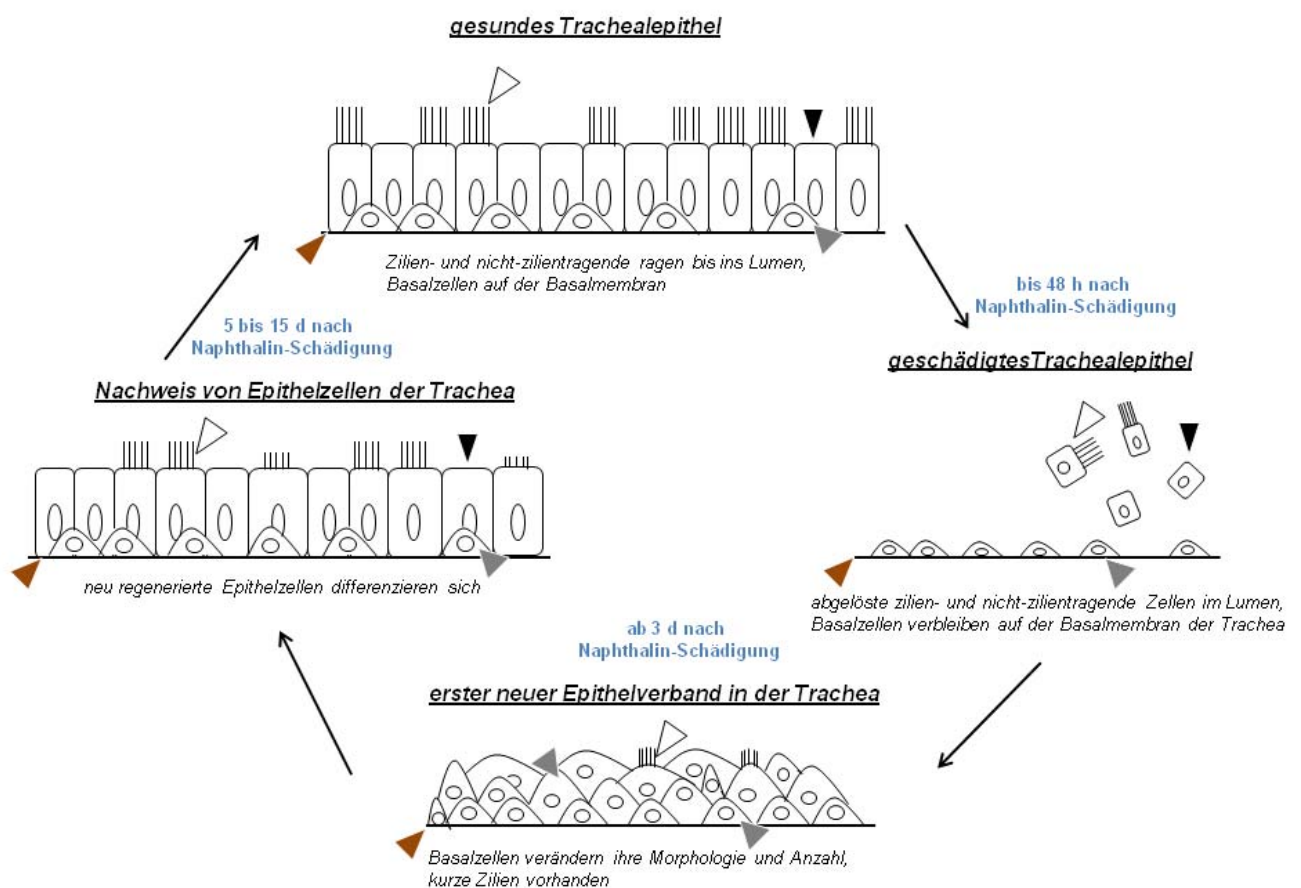


Abbildung 45 schematischer Darstellung der Schädigung und Regeneration des Trachealepithels nach Naphthalin-Gabe bis 15 d. Das gesunde Trachealepithel besitzt an der Basalmembran haftende zilientragende, nicht-zilientragende und Basalzellen. Ist Naphthalin anwesend werden innerhalb von 48 h alle zilien- und nicht-zilientragende Zellen abgelöst, wobei nur noch die Basalzellen die Basalmembran bedecken. Bereits 3 d nach Naphthalin-Gabe ist ein erster geschlossener Epithelverband mit kurzen Zilien sichtbar. Die Basalzellen haben ihre Morphologie und ihre Anzahl verändert. Ab 5 d nach Naphthalin-Gabe können erste nicht-zilientragende Zellen wieder nachgewiesen werden, da die Epithelzellen sich weiter differenzieren. 15 d nach Naphthalin-Gabe ist das Epithel vollständig regeneriert. Zilientragende Zellen (weiße Pfeilspitze, nicht-zilientragende Zellen (schwarze Pfeilspitze), Basalzellen (graue Pfeilspitze) und Basalmembran (braune Pfeilspitze).

5.2.3 Zilienvermittelter Partikeltransport des Trachealepithels nach Naphthalin-Gabe

In einem gesunden Epithel der Lunge ist die mukoziliäre Reinigung ein wichtiger Abwehrmechanismus des respiratorischen Systems, um inhalede Partikel zu eliminieren (Lippmann et al., 1980). Durch den gerichteten Zilienschlag werden die Partikel mit der Schleimschicht abtransportiert (Wanner et al., 1996).

In meinen Untersuchungen wurde das Epithel der Trachea zweimal mit HEPES-Ringerlösung gespült und der Mukus somit höchstwahrscheinlich entfernt. Anschließend konnten die Partikel durch Bewegung der Zilien in einem Flüssigkeitsstrom transportiert werden und nicht über eine Schleimschicht, wie es auch Bermbach et al. (2014) beschrieben haben. Ich habe das Epithel der Trachea 4 d und 15 d nach Naphthalin-Gabe hinsichtlich der Transportleistung und des Zilienschlags untersucht. Der Zeitpunkt 4 d nach Naphthalin-Gabe wurde gewählt, weil hier ein geschlossener Epithelverband mit kurzen Zilien vorhanden war und geprüft werden sollte, ob die zilientragenden Zellen fähig sind Partikel normal transportieren zu können. Obwohl die Zilienschlagfrequenz normal war, war der Transport gegenüber den Kontrollen jedoch stark vermindert (Abb. 26). Dies könnte durch die kurzen Zilien sowie wenigen zilientragenden Zellen hervorgerufen worden sein (Abb. 13). 15 d nach Naphthalin-Gabe war das Epithel der Trachea wieder vollständig regeneriert, was man daran erkennen konnte, dass die Anzahl der zilientragenden, nicht-zilientragenden und Basalzellen über dem Bandbereich gleich blieb gegenüber den Kontrollen (Abb. 42) und es über dem Knorpelbereich lediglich eine geringfügige Verschiebung in der Anzahl der Epithelzellen gegenüber den Kontroll-Tieren gab (Abb. 42). Durch die normale Anzahl an zilientragenden Zellen wurde der Transport von Partikeln 15 d nach Naphthalin-Gabe im Trachealepithel wieder gewährleistet (Abb. 26). Bei einem von insgesamt sechs Naphthalin-behandelten Tieren wurden im Partikeltransport Wirbel nach 15 d beobachtet. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass sich das Epithel während der Regeneration fehlerhaft entwickelt hat.

Ein normaler Partikeltransport nach Schädigung mit Naphthalin wird wieder gewährleistet, wenn das Epithel nach 15 d regeneriert ist und die Zilien eine normale Länge aufweisen. Ein geschlossener Epithelverband mit kurzen Zilien, wie er vier Tage nach Schädigung beobachtet werden kann, ist noch nicht in der Lage den effektiven Transport von Partikeln zu gewährleisten.

5.2.4 Zeitpunktdefinition für die Intervention mit LPS

Durch meine Daten konnte ich im Gegensatz zu Cole et al. (2010) weitere Informationen zum zeitlichen Verlauf der Schädigung und Regeneration des Trachealepithels zeigen. Zum Einen konnte ich nachweisen, dass die Ablösung nicht-zilientragender und zilientragender

Zellen bereits 12 h nach Naphthalin-Gabe begonnen hatte und nach 48 h nur noch Basalzellen vorhanden waren (Abb. 8 bis 10). Des Weiteren konnte ich zeigen, dass erste kurze Zilien bereits 72 h (3 d) nach Naphthalin-Gabe wieder beobachtet wurden (Abb. 12) und nicht erst 6 d nach Naphthalin-Gabe wie Cole et al. (2010) es beschrieben haben. Angesichts der frühen Zilien scheinen sich die zilientragenden Zellen bereits vor den nicht-zilientragenden Zellen zu differenzieren. Grund dafür ist höchstwahrscheinlich die schnellst mögliche Aktivierung der zilienvermittelnden Abwehrfunktion.

Zudem konnte ich bestätigen, dass die Basalzellen die einzig verbleibenden Zellen auf der Basalmembran waren. Aufgrund der Veränderung in ihrer Morphologie und Anzahl, sind die Basalzellen die proliferierenden Zellen.

Des Weiteren konnte ich zeigen, dass der zilienvermittelte Transport 15 d nach Naphthalin-Gabe wieder effektiv funktioniert (Abb. 26).

Für die Intervention mit LPS sollten die Zellen im Trachealepithel proliferieren bzw. differenzieren, so dass eventuelle Unterschiede in der Regeneration beobachtet werden können.

Um herauszufinden, wie eine einmalige Gabe von bakteriellen Bestandteilen (LPS) das Trachealepithel *in vivo* beeinflussen kann, wurden daher zwei verschiedene Zeitpunkte für die Applikation gewählt. Aus meinen Untersuchungen geht hervor, dass 48 h nach Naphthalin-Gabe nur noch die Basalzellen auf der Basalmembran des Trachealepithels vorhanden waren. Dieser Zeitpunkt wurde gewählt, weil die Zellen bereits proliferierten und noch nicht differenzierten. Außerdem wurde der Zeitpunkt 60 h nach Naphthalin-Gabe gewählt, weil das der früheste Zeitpunkt der beginnenden Differenzierung war.

5.3 Einfluss von LPS auf das Epithel der Trachea der Maus

5.3.1 Auswirkung von LPS auf die Proliferation und Differenzierung des Trachealepithels

2008 zeigten Shaykhiev und Kollegen, dass LPS einen positiven Effekt auf die Regeneration des geschädigten Atemwegsepithels *in vitro* hat. Durch LPS werden die Epithelzellen zur Proliferation stimuliert und können durch anschließende Zellmigration schneller regenerieren. In Zellkulturexperimenten wirkt LPS nur auf die vorhandenen Zellen und nicht auf ein komplettes Immunsystem, wie in den *in vivo*-Experimenten. Der Effekt von LPS kann auf die Regeneration des Epithels im Organismus daher ganz anders verlaufen als *in vitro*. Es sollte daher geklärt werden, ob LPS *in vivo* genauso unterstützend oder eher schädigend auf die Regeneration des Atemwegsepithels wirkt.

Meine Untersuchungen ergaben, dass eine einmalige Gabe von LPS nach Naphthalin-Gabe

keine schnellere Wundheilung im Trachealepithel bewirkte, sondern zu einer Inhibition der frühen Regeneration durch einen Proliferationsstopp führte.

Es wurde bereits in anderen Geweben festgestellt, dass LPS die Proliferation inhibiert. 2005 zeigten Müller-Decker und Kollegen, dass LPS als potentieller Inhibitor der Proliferation bei epithelialen RTE 2 Zellen (Epithelzellen aus der Ratten-Zunge) fungiert. Durch Behandlung mit einer Mischung aus 13 verschiedenen endotoxisch hoch aktiven LPS-Stämmen, darunter der auch von mir verwendete *E. coli*-Stamm (0111:B4), wurden die RTE 2 Zellen in ihrer Proliferation inhibiert. Die Arbeitsgruppe um Müller-Decker beschrieb, dass der inhibitorische Effekt von Lipid A völlig reversibel ist, wenn der Inhibitor entfernt wurde. Hierbei spielt die Struktur des Lipid A eine wesentliche Rolle bei der Inhibition der Proliferation (Lien et al., 2000; Müller-Decker et al., 2005). Dazu wurden zwei verschiedene Lipid A Strukturen auf ihren anti-proliferierenden Effekt hin untersucht. Zum Einen bakterielles und synthetisches Lipid A (C506), welches ebenfalls die Zellproliferation der RTE 2 Zellen inhibiert. Zum Anderen den biosynthetischen Lipid A Precursor Ia (C406), welcher die Zellproliferation nicht inhibiert (Müller-Decker et al., 2005). Die Autoren beschrieben weiterhin, dass der anti-proliferative Effekt von LPS durch den NF- κ B-Signalweg vermittelt wurde. Und zwar konnte durch eine gegebene nicht-toxische Konzentration von NF- κ B-IP (IP, inhibitorisches Peptid) das Zellwachstum der RTE 2 Zellen wieder hergestellt werden, wenn die RTE 2 Zellen vorher für 72 h mit LPS behandelt wurden. Wird also die NF- κ B-Aktivierung durch NF- κ B-IP inhibiert (Lin et al., 1995), so wird das Wachstum der Zellen wieder aktiviert. Des Weiteren wurde ein anti-proliferativer Effekt in der Epidermis von verschiedenen Mäusen *in vivo* beobachtet (Müller-Decker et al., 2005).

Diese Inhibition der Zellproliferation von LPS habe ich ebenfalls beobachtet. Aus meinen vorangegangenen Experimenten konnte ich zeigen, dass die Zellproliferation bereits 24 h nach Naphthalin-Gabe begonnen hatte (Abb. 23). Durch eine Intervention mit LPS 48 h nach Naphthalin-Gabe kam es zur Unterbrechung der Proliferation, so dass die Differenzierung der Zellen bis 4 d nach Naphthalin-Gabe nicht erfolgen konnte (Abb. 34). Wurde dagegen 60 h nach Naphthalin-Gabe interveniert (12 h später), war 4 d nach Naphthalin-Gabe ein nahezu geschlossener Epithelverband zu beobachten (Abb. 27J-L). Hier hatten die Zellen genügend Zeit zu proliferieren (bis 60 h nach Naphthalin-Gabe), um einen ersten Epithelverband zu regenerieren. Allerdings konnte hier ebenfalls 4 d nach Naphthalin-Gabe ein Proliferationsstopp festgestellt werden. Im Gegensatz dazu, wurde eine Zellproliferation ohne Intervention mit LPS 4 d nach Naphthalin-Gabe beobachtet (Abb. 23). Ohne LPS-Gabe waren 38,2% proliferierende Zellen und nach einmaliger LPS-Gabe nur noch 7% proliferierende Zellen 4 d nach Naphthalin-Gabe im Trachealepithel vorhanden (Abb. 34).

In dieser Arbeit sollte primär der Gesamteffekt einer einmaligen Gabe von LPS auf die Regeneration des Trachealepithels untersucht werden. Dazu wurde eine Konzentration

von 5 µg/g Mausgewicht LPS gewählt, die nicht letal wirkt, aber einen immunologischen Effekt erzielt (Matsuda et al., 2008). Es ist davon auszugehen, dass durch die intranasale Gabe von LPS nicht die gesamte Menge der verabreichten 5 µg/g über das Atemwegsepithel gelangte, sondern ein Teil in der Nase der Maus verblieb. Es ist außerdem wahrscheinlich, dass das Epithel nur für kurze Zeit mit LPS in Berührung gekommen ist, bevor es anschließend in die intrapulmonalen Atemwege gelang. Das in dem intrapulmonalen Atemwegsepithel verbliebene LPS bewirkte nur eine transiente Entzündung, so dass die Tiere nicht durch LPS gestorben sind. Obwohl mit der verwendeten Menge von LPS ein Proliferationsstopp während der Regeneration des Trachealepithels erzeugt wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine geringere Menge als 5 µg/g Mausgewicht LPS einen positiven Effekt auf das Trachealepithel bewirkt werden könnte. Da Müller-Decker et al. (2005) aber zeigten, dass bei niedriger Konzentration von LPS ebenfalls ein Proliferationsstopp hervorgerufen wird, sollte ein positiver Effekt ausgeschlossen werden können. Ein negativer Effekt auf die Regeneration des Trachealepithels könnte also auch mit einer geringeren Konzentration als 5 µg/g Mausgewicht LPS induziert werden.

Allerdings haben Shaykhiev et al. (2008) einen positiven Effekt von LPS auf die Wundheilung beobachtet. Die Arbeitsgruppe konnte *in vitro* eine erhöhte Zellproliferation mit anschließender Zellmigration von Atemwegsepithelzellen bei einer Gabe von 1 µg/ml LPS (*E. coli* 0111:B4) beobachten (Shaykhiev et al., 2008). Sie gehen davon aus, dass der positive Effekt der Wundheilung durch die Aktivierung von TLR 2 und/oder TLR 5 verursacht wurde, so dass neben LPS noch andere mikrobielle Bestandteile vorhanden waren. Denn mit einem anderen LPS-Stamm (ultra-pure) wurde kein signifikant positiver Effekt auf die Wundheilung beobachtet (Shaykhiev et al., 2008).

Meine Ergebnisse widersprechen der Theorie, dass LPS die Wundheilung im Trachealepithel beschleunigt. Im Gegensatz zu Shaykhiev et al. (2008) wurden meine Untersuchungen des Atemwegsepithels *in vivo* durchgeführt. Ein weiterer Unterschied ist die von mir verwendete Konzentration von LPS, die wesentlich höher war (5 µg/g) als die der Arbeitsgruppe um Shaykhiev (2008) (1 µg/ml).

Obwohl der gleiche LPS-Stammes aus *E. coli* (0111:B4) verwendet wurde, wurden *in vitro* und *in vivo* mit unterschiedlichen Konzentrationen (1 µg/ml versus 5 µg/g) unterschiedliche Proliferationseffekte während der Regeneration des Atemwegsepithels erzielt. Da, wie oben beschrieben, Müller-Decker et al. (2005) ebenfalls mit geringen Konzentrationen von LPS einen Proliferationsstopp beobachteten, spielt der durch LPS über TLR 4 induzierte NF-κB-Signalweg womöglich eine bedeutende Rolle.

Es ist bekannt, dass LPS über den TLR 4, der sich auf den Epithelzellen befindet (Medzhitov et al., 1997; Takeda et al., 2003; Basu und Fenton, 2004), den NF-κB-Signalweg aktiviert. Der TLR 4 gilt als zentraler physiologischer LPS-Rezeptor (Heine et al., 1999; Hirschfeld et

al., 2000; Yang et al., 2000). Wird also durch LPS ein Signal an die Zelle geleitet, kommt es zur Degradation des I κ B (inhibitorisches kB-Protein), welches im Zytoplasma an NF-kB gebunden ist und dadurch NF-kB im Zytoplasma zurückhält. Durch die Degradation von I κ B liegt nun NF-kB im Zytoplasma frei, kann in den Zellkern translozieren, dort an die DNA binden und die Transkription von Genen, wie pro-inflammatorischer Zytokine, beeinflussen (Karin und Ben-Neriah, 2000; Wang et al., 2001; Basu und Fenton, 2004; Chen, 2005; Hayden und Ghosh, 2004; Gilmore, 2006). Durch die spezifische Bindung von NF-kB an die DNA können transkriptionsfördernde oder –hemmende Wirkungen entstehen (Perkins, 2007).

Allerdings ist hier unklar, wie lange die proliferationshemmende Wirkung der Trachealepithelzellen durch das aktive NF-kB anhielt und wodurch diese Inhibition wieder aufgehoben wurde, da nach 15 d ein morphologisch regeneriertes Epithel vorhanden war. Außerdem ist unklar, warum Shaykhiev et al. (2008) keinen Proliferationsstopp beobachtet haben. Da der TLR 4 als der LPS-Rezeptor gilt, könnte dieser primär für negative Effekte und der TLR 2 sowie der TLR 5 für positive Effekte verantwortlich sein. Wird also LPS verabreicht, so wird *in vivo* das Signal höchstwahrscheinlich primär über den TLR 4 vermittelt.

Meine Daten zeigen also, dass die Zellen des Trachealepithels nach Naphthalin-Gabe normal proliferierten und differenzierten, während bei einer einmaligen Gabe von LPS während der Regeneration ein transients Proliferationsstopp, welcher wahrscheinlich durch eine TLR 4-Stimulation mit anschließender NF-kB-Aktivierung hervorgerufen wurde.

Auffällig war, dass LPS zu CC10-immunreaktiven Zellen führte. Jedoch nicht zu einer Erhöhung der mRNA-Expression gegenüber den 4 d Naphthalin-behandelten Tieren ohne LPS. Wenn CC10 ein Marker für die Differenzierung wäre, wäre die Regeneration nach LPS-Gabe schneller verlaufen. Meine histologischen Untersuchungen sprechen jedoch dagegen, denn diese zeigten ein schlechter regeneriertes Trachealepithel (Abb. 27G und 27H, 27J und 27K).

Aus der Literatur geht hervor, dass sich die Sekretion von CC10 nach LPS-Gabe in den intrapulmonalen Atemwegen verringert (Arsalane et al., 2000). Dagegen bleibt die mRNA-Expression nach einer LPS Administration unverändert (Hackett et al., 1992). Dies kann der Grund sein, warum sich die mRNA-Expression nach LPS-Gabe nicht verändert hat. Möglicherweise wird ständig eine geringe Menge an CC10 freigesetzt, die nun durch LPS inhibiert wurde, so dass das Protein CC10 in den nicht-zilientragenden Zellen akkumuliert und deswegen immunhistochemisch nachweisbar war.

LPS verzögert also kurzzeitig die Regeneration des Atemwegsepithels der Trachea der Maus. Bei einer Intervention mit LPS während der Proliferation (48 h nach Naphthalin-Gabe)

wurde also die Proliferation gestoppt und das Epithel regenerierte sich nicht bis 4 d nach Naphthalin-Gabe. Wurde dagegen 12 h später mit LPS interveniert (60 h nach Naphthalin-Gabe), also zum Zeitpunkt der beginnenden Differenzierung, so konnten sich die Epithelzellen bis 4 d nach Naphthalin-Gabe regenerieren. Der Zeitpunkt der LPS-Intervention spielt also eine entscheidende Rolle für den Verlauf der Regeneration der Epithelzellen bis 4 d nach Naphthalin-Gabe. 15 d nach Naphthalin-Gabe ist das Trachealepithel, obwohl mit LPS interveniert wurde, wieder regeneriert.

5.3.2 Auswirkung von LPS auf den Transport nach der Regeneration

eingeschränkter Transport in den Naphthalin-behandelten Tieren bei LPS-Gabe nach 60 h

Ein gerichteter Transport ist abhängig von korrekt ausgerichteten Zilien und Voraussetzung für ein gut funktionierendes Atemwegsepithel. Ist der Transport gestört, können inhalede Substanzen nicht mehr effektiv entfernt werden (Gudis et al., 2010). Die Applikation von LPS 48 h nach Naphthalin-Gabe verursachte keinen verminderten Transport nach 15 d gegenüber den dazugehörigen Kontrollen (Abb. 37). Dagegen wurde 60 h nach Naphthalin-Gabe eine signifikant verminderte Transportleistung im Trachealepithel nach 15 d gegenüber den Kontrollen beobachtet (Abb. 37). Insgesamt war die Transportleistung, der 15 d Naphthalin-behandelten Tiere ohne LPS besser als die Transportleistung der 15 d Naphthalin-behandelten Tiere mit LPS.

Eine verminderte Transportleistung könnte durch eine geringe Anzahl zilientragender Zellen im Epithel (Wanner et al., 1996) oder durch eine verminderte Zilienschlagfrequenz entstanden sein (Wanner et al., 1996; Henning et al., 2008). Außerdem wäre es möglich, dass der Transport von der Zilienlänge zilientragender Zellen abhängig ist.

Meine Untersuchungen zeigen, dass die Anzahl der zilientragenden Zellen nach 15 d über dem Band- und Knorpelbereich in den Naphthalin-behandelten Tieren, die zusätzlich LPS erhalten haben, im Vergleich zu den Kontroll-Tieren gleich blieb (Abb. 41). Somit kann eine verminderte Anzahl zilientragender Zellen als Ursache der verminderten Transportleistung ausgeschlossen werden.

2008 beobachteten Henning und Kollegen eine verringerte Transportleistung, wenn eine verringerte Zilienschlagfrequenz nachgewiesen wurde. Da bei der Intervention mit LPS 60 h nach Naphthalin-Gabe keine verminderte Zilienschlagfrequenz gemessen wurde (Abb. 36), ist die verringerte Transportleistung nicht auf die Zilienschlagfrequenz zurückzuführen. Bei meinen Untersuchungen der Transportleistung während der Regeneration 4 d nach Naphthalin-Gabe habe ich ebenfalls eine verminderte Transportleistung und eine normale Zilienschlagfrequenz beobachtet (Abb. 26 und 25). Hier wurden kurze Zilien zilientragender

Zellen in den REM-Aufnahmen und Semidünnschnitt-Färbungen festgestellt (Abb. 13A).

Es könnte also sein, dass der zusammengebrochene Transport auf die zu kurze Zilienlänge zurückzuführen ist. Durch Überprüfung der Fläche kurzer und normal langer Zilien in den REM-Aufnahmen von den 15 d Tieren, die nach 60 h LPS erhalten haben und auf ihre zilienvermittelte Transportleistung untersucht wurden, kann gesagt werden, dass von den ausgewerteten zilientragenden Zellen 15% kurze und 85% normal lange Zilien auf dem Trachealepithel der Naphthalin-behandelten Tiere vorhanden waren. In den dazugehörigen Kontrollen wurden dagegen nur 2% kurze und 98% normal lange Zilien auf den ausgewerteten zilientragenden Zellen ermittelt (Abb. 44). Zur Überprüfung der REM-Bilder wurden die dazugehörigen Transportfilme der 15 d Naphthalin-behandelten Tiere, die nach 60 h mit LPS behandelt wurden, nochmals visuell analysiert. Hier konnte bestätigt werden, dass bei den Tieren mit vermehrt kurzen Zilien ein eingeschränkter Transport beobachtet wurde.

Die Störung der Transportleistung kann mit der Störung der Differenzierung zilientragender Zellen 60 h nach Naphthalin-Gabe zusammenhängen. Eine mögliche Erklärung dafür wäre die entstandene Interaktion zwischen FoxJ1 und dem NF- κ B-Signalweg. Aus einer früheren Studie geht hervor, dass die Aktivierung von NF- κ B zu einer Inhibition von FoxJ1 führt (Lin et al., 2004). Bei den Tieren, die nach 48 h LPS erhalten haben, wurde hingegen keine verminderte Transportleistung durch verkürzte Zilien beobachtet. Hier hatte noch keine Differenzierung der Epithelzellen stattgefunden, so dass es zu keiner Inhibition von FoxJ1 hätte kommen können.

Neben der verminderten Transportleistung war auffällig, dass LPS-Gabe in Naphthalin-geschädigten Tracheen häufiger Wirbel beobachtet werden konnten. Allerdings kann die verminderte Transportleistung nicht eindeutig auf die Entstehung von Wirbeln zugeführt werden. Denn in den 15 d Naphthalin-behandelten Tieren, die nach 48 h LPS erhalten haben, wurden in insgesamt 3 von 6 Tieren Wirbel beobachtet, aber kein verminderter Transport festgestellt.

Vermehrte Wirbelbildung nach LPS-Gabe

Nach der Regeneration des Trachealepithels wurde verstärkt in den mit LPS behandelten Naphthalin-behandelten Tieren (5 von 12 Tieren) eine Störung in der Ausrichtung der zilientragenden Zellen festgestellt (Abb. 40).

Normalerweise sind in einem gesunden zilientragenden Epithel die Zilien genau in eine Richtung orientiert. Dieses Phänomen wird als planare Zellpolarität bezeichnet (PCP, *planar cell polarity*). Über den PCP-Signalweg (auch bezeichnet als Wnt/JNK (Jun N-terminale Kinase)-Signalweg) wird die Orientierung von Haaren und Borsten kontrolliert (Strutt et al., 1997; Veeman et al., 2003; Strutt, 2003). 2007 zeigten Jones und Chen, dass der PCP-

Signalweg die Haarzellpolarität steuern kann. Wird der PCP-Signalweg gestört, kommt es zu Defekten in der Haarzellpolarität (Montcouquiol et al., 2003). Dadurch kann die Orientierung von Haaren beeinträchtigt werden und es können sich Haarwirbel bilden (Guo et al., 2004, Wang et al., 2010).

Bisher befinden sich in der Literatur keine Daten zu Wirbeln oder ungerichtetem Transport durch nicht korrekt ausgerichtete zilientragende Zellen im Atemwegsepithel. Aus Studien zur Orientierung von Haarmustern geht hervor, dass eine Deletion des *Frizzled6* (*Fz6*)-Gens im PCP-Signalweg Wirbel verursacht (Guo et al. 2004, Wang et al., 2010). Es könnte also sein, dass im Atemwegsepithel ebenfalls eine Störung des PCP-Signalweges durch die Intervention mit LPS während der Regeneration der Epithelzellen hervorgerufen wurde und dadurch eine falsche Orientierung zilientrager Zellen entstanden ist.

Bisher ist der Zusammenhang zwischen dem PCP-Weg und LPS unklar. Hinzukommt, dass es keine Untersuchungen zum PCP-Weg im Atemwegsepithel gibt. Meine Daten legen jedoch nahe, dass LPS zu einer Störung des Atemwegsepithels führen kann, die den Transport beeinträchtigen, obwohl die Zellanzahl sich nach der Regeneration nicht verändert.

Interessanterweise haben meine Arbeitskollegen bei Transportuntersuchungen in humanen Atemwegen ebenfalls Wirbel im Atemwegsepithel beobachtet. Diese waren aber nicht im Trachealepithel, sondern in den intrapulmonalen Atemwegen vorhanden. Das humane Lungenmaterial kommt von älteren Patienten, die meist langjährige Raucher waren und bei denen ein Karzinom vermutet wurde. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass sich beim Menschen durch eine langfristige Störung Wirbel im Atemwegsepithel durch fehlerhaft ausgerichtete zilientragende Zellen entwickelt haben (Abb. 46).

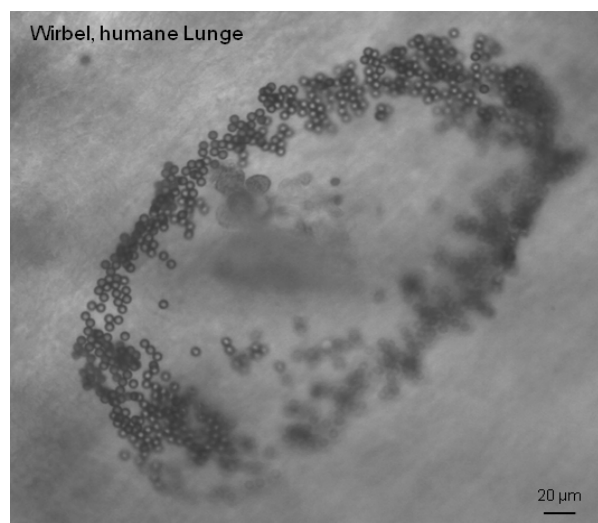


Abbildung 46 Partikel, die sich im humanen Atemwegsepithel der Lunge im Wirbel bewegen. Ein Partikel hat eine durchschnittliche Größe von 4,5 μm . Dieses Bild wurde mir mit freundlicher Genehmigung von Peter König und Karina Weinhold zur Verfügung gestellt.

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass durch eine einmalige Gabe von LPS während der Regeneration des Atemwegsepithels die Transportleistung des regenerierten Epithels langfristig vermindert werden kann, weil vermehrt kurze Zilien im sich noch immer regenerierenden Epithel vorhanden sind. Darüber hinaus kann die Orientierung der zilientragenden Zellen gestört werden, was sich im Atemwegsepithel als Wirbelbildung zeigt. Werden durch gebildete Wirbel im zilientragenden Atemwegsepithel Partikel nicht mehr ordnungsgemäß abtransportiert, könnte dies zu einer höheren Infektanfälligkeit führen. Langfristig ist es auch möglich, dass der lokal gestörte Transport die Tumorbildung im Epithel erhöhen könnte.

Eine schematische Zusammenfassung der Auswirkungen nach einmaliger Gabe von LPS ist in der Abbildung 47 dargestellt.

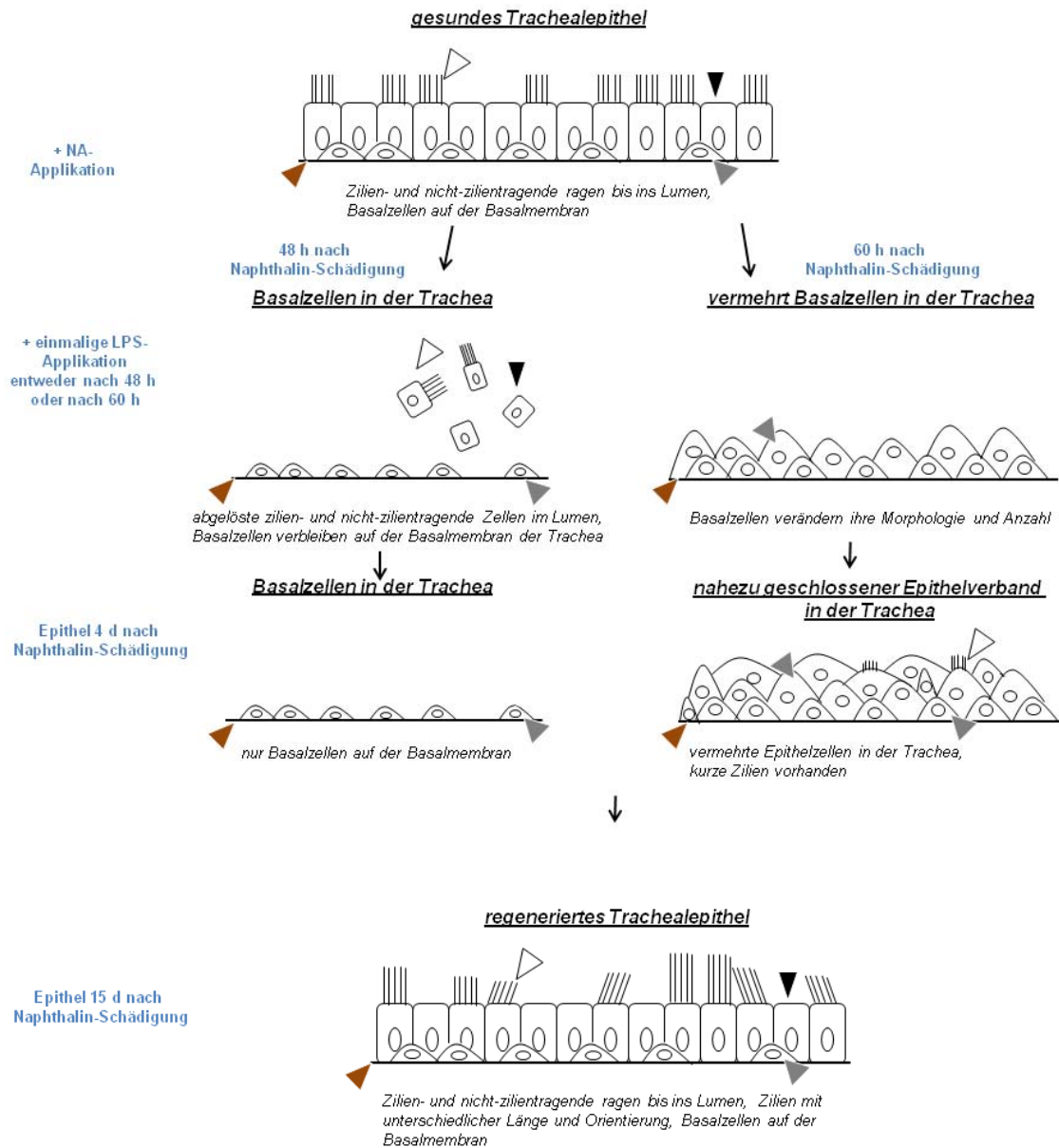


Abbildung 48 schematische Darstellung des Trachealepithels nach Naphthalin-Gabe, wenn zusätzlich nach 48 h oder 60 h mit LPS interveniert wurde.

Das gesunde Trachealepithel besitzt an der Basalmembran haftende zilientragende, nicht-zilientragende und Basalzellen. 48 h nach Naphthalin-Gabe sind nur noch Basalzellen auf der Basalmembran vorhanden. Wird zu diesem Zeitpunkt mit LPS interveniert, befinden sich 4 d nach Naphthalin-Gabe immer noch die Basalzellen alleine auf der Basalmembran. Wird 60 h nach Naphthalin-Gabe mit LPS interveniert, befinden sich 4 d nach Naphthalin-Gabe vermehrt Basalzellen auf der Basalmembran und es ist ein nahezu geschlossener Epithelverband mit kurzen Zilien zu beobachten. 15 d nach Naphthalin-Gabe ist das Trachealepithel regeneriert, jedoch mit vermehrt kurzen und falsch orientierten Zilien.

5.4 LPS kann langfristige Schäden verursachen

Meine Ergebnisse zeigen, dass eine einmalige Gabe von LPS einen Proliferationsstopp während der frühen Regeneration (36 h bis 48 h nach LPS-Gabe) auslöst. Obwohl die Regeneration kurzzeitig gestört wurde (4 d nach Naphthalin-Gabe), war das Trachealepithel 15 d nach Naphthalin-Gabe morphologisch wieder regeneriert. Dieses morphologisch regenerierte Trachealepithel besaß 15 d nach Naphthalin-Gabe, wenn zusätzlich mit LPS interveniert wurde, eine gleichbleibende Anzahl zilientragender Zellen, während nicht-zilientragende Zellen und Basalzellen geringfügig verschoben im Vergleich zu dem nur mit Naphthalin regenerierten Trachealepithel. Viel wichtiger jedoch war die Auswirkung von LPS auf die Funktion des regenerierten Trachealepithels. Es schien zwar in seiner Zellanzahl zilientragender Zellen unauffällig zu sein, zeigte aber eine eingeschränkte Transportleistung. Diese verminderte Transportleistung war auf zwei Faktoren zurückzuführen: a) vermehrt kurze Zilien zilientragender Zellen und b) falsche Orientierung der zilientragenden Zellen.

LPS während der Regeneration könnte dazu führen, dass die Atemwege langfristig schlechter infektiöse oder toxische Substanzen transportieren und daher anfälliger für Infektionen und die Bildung von Tumoren sind.

6 Zusammenfassung

Ein gesundes und nicht-geschädigtes Atemwegsepithel ist für einen geregelten Abtransport von Fremdstoffen notwendig. Die Atemwege sind allerdings ständig schädigenden Einflüssen ausgesetzt und es kommt kontinuierlich zu Epitheldefekten. Diese können den Eintritt von Infektionserregern, Allergenen und Umweltnoxen erleichtern. Daher muss die Regeneration des Atemwegsepithels schnellstmöglich ablaufen, um weitere Schäden zu verhindern. Aus einer *in vitro*-Studie gibt es Hinweise, dass bakterielle Bestandteile wie Lipopolysaccharide (LPS) die Wundheilung eines geschädigten Atemwegsepithels fördern können, allerdings ist bisher unklar, ob dies *in vivo* auch der Fall ist.

Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, welche Auswirkung LPS auf die Regeneration des Trachealepithels der Maus *in vivo* während der Proliferationsphase sowie der Differenzierungsphase des Epithels hat. Hierzu wurde in einem ersten Schritt das Naphthalin-Schädigungsmodell, das bisher nur für distale Atemwege gut etabliert war, an der murinen Trachea untersucht, um geeignete Interventionszeitpunkte zu definieren. Meine Untersuchungen haben gezeigt, dass Naphthalin im Trachealepithel neben der Ablösung der nicht-zilientragenden Zellen ein zusätzliches Ablösen der zilientragenden Zellen innerhalb von 48 h bewirkte. Die einzig verbleibenden Epithelzellen in der Trachea waren die Basalzellen, die bereits binnen 24 h begannen zu proliferieren. Bereits 3 d nach Naphthalin-Gabe konnte ein erster neuer Epithelverband mit kurzen Zilien beobachtet werden. 15 d nach Naphthalin-Gabe besaß die Trachea ein komplett neu regeneriertes Epithel, bei dem der Zilienschlag und der Partikeltransport gewährleistet werden konnten. Für die Intervention mit LPS wurde 48 h nach Naphthalin-Gabe gewählt, weil zu diesem Zeitpunkt nur Zellproliferation aber noch keine Differenzierung festzustellen war (48 h: Proliferation). Außerdem wurde 60 h nach Naphthalin-Gabe ausgewählt, da dies der früheste Zeitpunkt der beginnenden Differenzierung war (60 h: Differenzierung). Durch die einmalige Gabe von LPS 48 h sowie 60 h nach Naphthalin-Gabe war die Proliferation 4 d nach Naphthalin-Gabe stark reduziert. Bei Gabe nach 48 h besaß die Trachea 4 d nach Naphthalin-Gabe keine differenzierten Epithelzellen. Bei LPS-Gabe nach 60 h konnte hingegen ein nahezu geschlossener Epithelverband nachgewiesen werden, dessen Differenzierung aber gegenüber der Kontrolle verzögert war. Nach 15 d war bei LPS-behandelten Tracheen ein morphologisch regeneriertes Epithel mit einer normalen Zilienschlagfrequenz nachweisbar. Allerdings war bei LPS-Gabe nach 60 h LPS die Partikeltransportgeschwindigkeit nach 15 d reduziert, was auf eine gestörte Regeneration von zilientragenden Zellen zurückgeführt wurde. Zusätzlich wurde nach LPS-Gabe vermehrt eine Störung der Ausrichtung zilientragender Zellen teilweise mit Wirbelbildung im Epithel beobachtet.

Diese Untersuchungen zeigen, dass es nach einer einmaligen Applikation von LPS während der Differenzierung des Trachealepithels trotz weitgehender Regeneration des Epithels zu anhaltenden Beeinträchtigungen des Partikeltransports kommen kann. Dies kann die Atemwege anfälliger für Infektionen und die Bildung von Tumoren machen. Eine fördernde Wirkung von LPS bei der Regeneration des Atemwegsepithels konnte nicht nachgewiesen werden.

7 Literaturverzeichnis

Aherne W, Bird T, Court SD, Gardner PS, McQuillin J. (1970): Pathological changes in virus infections of the lower respiratory tract in children. In: *J Clin Pathol.* 1970 Feb;23(1):7-18.

Akira S, Takeda K. (2004): Toll-like receptor signalling. In: *Nat Rev Immunol.* 2004 Jul;4(7):499-511.

Akira S. (2003): Toll-like receptor signaling. In: *J Biol Chem.* 2003 Oct 3;278(40):38105-8. Epub 2003 Jul 30.

Arsalane K, Broeckaert F, Knoops B, Wiedig M, Toubreau G, Bernard A. (2000): Clara cell specific protein (CC16) expression after acute lung inflammation induced by intratracheal lipopolysaccharide administration. In: *Am J Respir Crit Care Med.* 2000 May;161(5):1624-30.

Babu D, Roy S. (2013): Left-right asymmetry: cilia stir up new surprises in the node. In: *Open Biol.* 2013 May 29;3(5):130052. doi: 10.1098/rsob.130052.

Basu S, Fenton MJ. (2004): Toll-like receptors: function and roles in lung disease. In: *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2004 May;286(5):L887-92.

Bermbach S, Weinhold K, Roeder T, Petersen F, Kugler C, Goldmann T, Rupp J, König P. (2014): Mechanisms of Cilia-Driven Transport in the Airways in the Absence of Mucus. In: *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2014 Jan 27. [Epub ahead of print].

Blatt EN, Yan XH, Wuerffel MK, Hamilos DL, Brody SL. (1999): Forkhead transcription factor HFH-4 expression is temporally related to ciliogenesis. In: *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1999 Aug;21(2):168-76.

Boers JE, Ambergen AW, Thunnissen FB. (1998): Number and proliferation of basal and parabasal cells in normal human airway epithelium. In: *Am J Respir Crit Care Med.* 1998 Jun;157(6 Pt 1):2000-6.

Boers JE, Ambergen AW, Thunnissen FB. (1999): Number and proliferation of clara cells in normal human airway epithelium. In: *Am J Respir Crit Care Med.* 1999 May;159(5 Pt 1):1585-91.

- Bolton SJ, Pinnion K, Marshall CV, Wilson E, Barker JE, Oreffo V, Foster ML. (2008): Changes in Clara cell 10 kDa protein (CC10)-positive cell distribution in acute lung injury following repeated lipopolysaccharide challenge in the rat. In: *Toxicol Pathol.* 2008 Apr;36(3):440-8. doi: 10.1177/0192623308315357. Epub 2008 Apr 17.
- Borthwick DW, Shahbazian M, Krantz QT, Dorin JR, Randell SH. (2001): Evidence for stem-cell niches in the tracheal epithelium. In: *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2001 Jun;24(6):662-70.
- Brody SL, Yan XH, Wuerffel MK, Song SK, Shapiro SD. (2000): Ciliogenesis and left-right axis defects in forkhead factor HFH-4-null mice. In: *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2000 Jul;23(1):45-51.
- Buckpitt A, Buonarati M, Avey LB, Chang AM, Morin D, Plopper CG. (1992): Relationship of cytochrome P450 activity to Clara cell cytotoxicity. II. Comparison of stereoselectivity of naphthalene epoxidation in lung and nasal mucosa of mouse, hamster, rat and rhesus monkey. In: *J Pharmacol Exp Ther.* 1992 Apr;261(1):364-72.
- Buckpitt A, Chang AM, Weir A, Van Winkle L, Duan X, Philpot R, Plopper C. (1995): Relationship of cytochrome P450 activity to Clara cell cytotoxicity. IV. Metabolism of naphthalene and naphthalene oxide in microdissected airways from mice, rats, and hamsters. In: *Mol Pharmacol.* 1995 Jan;47(1):74-81.
- Bustos ML, Mura M, Marcus P, Hwang D, Ludkovski O, Wong AP, Waddell TK. (2013): Bone marrow cells expressing clara cell secretory protein increase epithelial repair after ablation of pulmonary clara cells. In: *Mol Ther.* 2013 Jun;21(6):1251-8. doi: 10.1038/mt.2013.53. Epub 2013 Apr 23.
- Cai C, Xu J, Zhang M, Chen XD, Li L, Wu J, Lai HW, Zhong NS. (2008): Prior SO₂ exposure promotes airway inflammation and subepithelial fibrosis following repeated ovalbumin challenge. In: *Clin Exp Allergy.* 2008 Oct;38(10):1680-7. doi: 10.1111/j.1365-2222.2008.03053.x. Epub 2008 Jun 23.
- Chen ZJ. (2005): Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway. In: *Nat Cell Biol.* 2005 Aug;7(8):758-65.
- Chow JC, Young DW, Golenbock DT, Christ WJ, Gusovsky F. (1999): Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. In: *J Biol Chem.* 1999 Apr 16;274(16):10689-92.

- Cole BB, Smith RW, Jenkins KM, Graham BB, Reynolds PR, Reynolds SD. (2010): Tracheal Basal cells: a facultative progenitor cell pool. In: *Am J Pathol.* 2010 Jul;177(1):362-76. doi: 10.2353/ajpath.2010.090870. Epub 2010 Jun 3.
- De Water R, Willems LN, Van Muijen GN, Franken C, Franssen JA, Dijkman JH, Kramps JA. (1986): Ultrastructural localization of bronchial antileukoprotease in central and peripheral human airways by a gold-labeling technique using monoclonal antibodies. In: *Am Rev Respir Dis.* 1986 May;133(5):882-90.
- Erjefält JS, Erjefält I, Sundler F, Persson CG. (1995): In vivo restitution of airway epithelium. In: *Cell Tissue Res.* 1995 Aug;281(2):305-16.
- Evans MJ, Plopper CG. (1988): The role of basal cells in adhesion of columnar epithelium to airway basement membrane. In: *Am Rev Respir Dis.* 1988 Aug;138(2):481-3.
- Evans MJ, Van Winkle LS, Fanucchi MV, Plopper CG. (2001): Cellular and molecular characteristics of basal cells in airway epithelium. In: *Exp Lung Res.* 2001 Jul-Aug;27(5):401-15.
- Fanucchi MV, Murphy ME, Buckpitt AR, Philpot RM, Plopper CG. (1997): Pulmonary cytochrome P450 monooxygenase and Clara cell differentiation in mice. In: *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1997 Sep;17(3):302-14.
- Gilmore TD. (2006): Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. In: *Oncogene.* 2006 Oct 30;25(51):6680-4.
- Gomperts BN, Gong-Cooper X, Hackett BP. (2004): Foxj1 regulates basal body anchoring to the cytoskeleton of ciliated pulmonary epithelial cells. In: *J Cell Sci.* 2004 Mar 15;117(Pt 8):1329-37. Epub 2004 Mar 2.
- Gudis DA, Cohen NA. (2010): Cilia dysfunction. In: *Otolaryngol Clin North Am.* 2010 Jun;43(3):461-72, vii. doi: 10.1016/j.otc.2010.02.007.
- Guillot L, Medjane S, Le-Barillec K, Balloy V, Danel C, Chignard M, Si-Tahar M. (2004): Response of human pulmonary epithelial cells to lipopolysaccharide involves Toll-like receptor 4 (TLR4)-dependent signaling pathways: evidence for an intracellular compartmentalization of TLR4. In: *J Biol Chem.* 2004 Jan 23;279(4):2712-8. Epub 2003 Nov 4.

Guo N, Hawkins C, Nathans J. (2004): Frizzled6 controls hair patterning in mice. In: *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jun 22;101(25):9277-81. Epub 2004 May 28.

Hayden MS, Ghosh S. (2004): Signaling to NF-kappaB. In: *Genes Dev*. 2004 Sep 15;18(18):2195-224.

Heine H, Kirschning CJ, Lien E, Monks BG, Rothe M, Golenbock DT. (1999): Cutting edge: cells that carry a null allele for toll-like receptor 2 are capable of responding to endotoxin. In: *J Immunol*. 1999 Jun 15;162(12):6971-5.

Henning A, Schneider M, Bur M, Blank F, Gehr P, Lehr CM. (2008): Embryonic chicken trachea as a new in vitro model for the investigation of mucociliary particle clearance in the airways. In: *AAPS PharmSciTech*. 2008;9(2):521-7. doi: 10.1208/s12249-008-9072-6. Epub 2008 Apr 2.

Hirschfeld M, Ma Y, Weis JH, Vogel SN, Weis JJ. (2000): Cutting edge: repurification of lipopolysaccharide eliminates signaling through both human and murine toll-like receptor 2. In: *J Immunol*. 2000 Jul 15;165(2):618-22.

Hong KU, Reynolds SD, Giangreco A, Hurley CM, Stripp BR. (2001): Clara cell secretory protein-expressing cells of the airway neuroepithelial body microenvironment include a label-retaining subset and are critical for epithelial renewal after progenitor cell depletion. In: *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2001 Jun;24(6):671-81.

Hong KU, Reynolds SD, Watkins S, Fuchs E, Stripp BR. (2004): Basal cells are a multipotent progenitor capable of renewing the bronchial epithelium. In: *Am J Pathol*. 2004 Feb;164(2):577-88.

Hong KU, Reynolds SD, Watkins S, Fuchs E, Stripp BR. (2004): In vivo differentiation potential of tracheal basal cells: evidence for multipotent and unipotent subpopulations. In: *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004 Apr;286(4):L643-9. Epub 2003 Jul 18.

Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, Takeda K, Akira S. (1999): Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. In: *J Immunol*. 1999 Apr 1;162(7):3749-52.

- Jackson DJ, Johnston SL. (2010): The role of viruses in acute exacerbations of asthma. In: *J Allergy Clin Immunol*. 2010 Jun;125(6):1178-87; quiz 1188-9. doi: 10.1016/j.jaci.2010.04.021.
- Jany B, Betz R, Schreck R. (1995): Activation of the transcription factor NF-kappa B in human tracheobronchial epithelial cells by inflammatory stimuli. In: *Eur Respir J*. 1995 Mar;8(3):387-91.
- Jones C, Chen P. (2007): Planar cell polarity signaling in vertebrates. In: *Bioessays*. 2007 Feb;29(2):120-32.
- Jorens PG, Sibille Y, Goulding NJ, van Overveld FJ, Herman AG, Bossaert L, De Backer WA, Lauwerys R, Flower RJ, Bernard A. (1995): Potential role of Clara cell protein, an endogenous phospholipase A2 inhibitor, in acute lung injury. In: *Eur Respir J*. 1995 Oct;8(10):1647-53.
- Karin M, Ben-Neriah Y. (2000): Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. In: *Annu Rev Immunol*. 2000;18:621-63.
- Kim HY, DeKruyff RH, Umetsu DT. (2010): The many paths to asthma: phenotype shaped by innate and adaptive immunity. In: *Nat Immunol*. 2010 Jul;11(7):577-84. doi: 10.1038/ni.1892. Epub 2010 Jun 18.
- Klug J, Beier HM, Bernard A, Chilton BS, Fleming TP, Lehrer RI, Miele L, Pattabiraman N, Singh G. (2000): Uteroglobin/Clara cell 10-kDa family of proteins: nomenclature committee report. In: *Ann N Y Acad Sci*. 2000;923:348-54.
- Kuan SF, Rust K, Crouch E. (1992): Interactions of surfactant protein D with bacterial lipopolysaccharides. Surfactant protein D is an Escherichia coli-binding protein in bronchoalveolar lavage. In: *J Clin Invest*. 1992 Jul;90(1):97-106.
- Lien E, Means TK, Heine H, Yoshimura A, Kusumoto S, Fukase K, Fenton MJ, Oikawa M, Qureshi N, Monks B, Finberg RW, Ingalls RR, Golenbock DT. (2000): Toll-like receptor 4 imparts ligand-specific recognition of bacterial lipopolysaccharide. In: *J Clin Invest*. 2000 Feb;105(4):497-504.
- Lin L, Spoor MS, Gerth AJ, Brody SL, Peng SL. (2004): Modulation of Th1 activation and inflammation by the NF-kappaB repressor Foxj1. In: *Science*. 2004 Feb 13;303(5660):1017-20.

Lin YZ, Yao SY, Veach RA, Torgerson TR, Hawiger J. (1995): Inhibition of nuclear translocation of transcription factor NF-kappa B by a synthetic peptide containing a cell membrane-permeable motif and nuclear localization sequence. In: *J Biol Chem.* 1995 Jun 16;270(24):14255-8.

Lippmann M, Yeates DB, Albert RE. (1980): Deposition, retention, and clearance of inhaled particles. In: *Br J Ind Med.* 1980 Nov;37(4):337-62.

Matsuda N, Yamazaki H, Takano K, Matsui K, Takano Y, Kemmotsu O, Hattori Y. (2008): Priming by lipopolysaccharide exaggerates acute lung injury and mortality in responses to peptidoglycan through up-regulation of Toll-like receptor-2 expression in mice. In: *Biochem Pharmacol.* 2008 Mar 1;75(5):1065-75. Epub 2007 Nov 9.

Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. (1997): A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. In: *Nature.* 1997 Jul 24;388(6640):394-7.

Mercke U, Toremalm NG. (1976): Air humidity and mucociliary activity. In: *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1976 Jan-Feb;85(1 Pt 1):32-7.

Mercke U. (1974): The influence of temperature on mucociliary activity. Temperature range 40 degrees C to 50 degrees C. In: *Acta Otolaryngol.* 1974 Sep-Oct;78(3-4):253-8.

Montcouquiol M, Rachel RA, Lanford PJ, Copeland NG, Jenkins NA, Kelley MW. (2003): Identification of Vangl2 and Scrb1 as planar polarity genes in mammals. In: *Nature.* 2003 May 8;423(6936):173-7. Epub 2003 Apr 30.

Müller-Decker K, Manegold G, Butz H, Hinz DE, Hüttner D, Richter KH, Tremmel M, Weissflog R, Marks F. (2005): Inhibition of cell proliferation by bacterial lipopolysaccharides in TLR4-positive epithelial cells: independence of nitric oxide and cytokine release. In: *J Invest Dermatol.* 2005 Mar;124(3):553-61.

Nakahari T. (2007): Regulation of ciliary beat frequency in airways: shear stress, ATP action, and its modulation. In: *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2007 Mar;292(3):L612-3.

Oliver JR, Kushwah R, Wu J, Cutz E, Yeger H, Waddell TK, Hu J. (2009): Gender differences in pulmonary regenerative response to naphthalene-induced bronchiolar

epithelial cell injury. In: *Cell Prolif.* 2009 Oct;42(5):672-87. doi: 10.1111/j.1365-2184.2009.00629.x. Epub 2009 Jul 9.

Pace E, Ferraro M, Siena L, Melis M, Montalbano AM, Johnson M, Bonsignore MR, Bonsignore G, Gjomarkaj M. (2008): Cigarette smoke increases Toll-like receptor 4 and modifies lipopolysaccharide-mediated responses in airway epithelial cells. In: *Immunology.* 2008 Jul;124(3):401-11. doi: 10.1111/j.1365-2567.2007.02788.x. Epub 2008 Jan 22.

Pack RJ, Al-Ugaily LH, Morris G. (1981): The cells of the tracheobronchial epithelium of the mouse: a quantitative light and electron microscope study. In: *J Anat.* 1981 Jan;132(Pt 1):71-84.

Park KS, Wells JM, Zorn AM, Wert SE, Laubach VE, Fernandez LG, Whitsett JA. (2006): Transdifferentiation of ciliated cells during repair of the respiratory epithelium. In: *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2006 Feb;34(2):151-7. Epub 2005 Oct 20.

Peake JL, Reynolds SD, Stripp BR, Stephens KE, Pinkerton KE. (2000): Alteration of pulmonary neuroendocrine cells during epithelial repair of naphthalene-induced airway injury. In: *Am J Pathol.* 2000 Jan;156(1):279-86.

Perkins ND. (2007): Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. In: *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 Jan;8(1):49-62.

Persinger RL, Poynter ME, Ckless K, Janssen-Heininger YM. (2002): Molecular mechanisms of nitrogen dioxide induced epithelial injury in the lung. In: *Mol Cell Biochem.* 2002 May-Jun;234-235(1-2):71-80.

Phelps DS, Floros J. (1991): Localization of pulmonary surfactant proteins using immunohistochemistry and tissue in situ hybridization. In: *Exp Lung Res.* 1991 Nov-Dec;17(6):985-95.

Plopper CG, Macklin J, Nishio SJ, Hyde DM, Buckpitt AR. (1992a): Relationship of cytochrome P-450 activity to Clara cell cytotoxicity. III. Morphometric comparison of changes in the epithelial populations of terminal bronchioles and lobar bronchi in mice, hamsters, and rats after parenteral administration of naphthalene. In: *Lab Invest.* 1992 Nov;67(5):553-65.

Plopper CG, Suverkropp C, Morin D, Nishio S, Buckpitt A. (1992b): Relationship of cytochrome P-450 activity to Clara cell cytotoxicity. I. Histopathologic comparison of the

respiratory tract of mice, rats and hamsters after parenteral administration of naphthalene. In: *J Pharmacol Exp Ther.* 1992 Apr;261(1):353-63.

Plopper CG, Van Winkle LS, Fanucchi MV, Malburg SR, Nishio SJ, Chang A, Buckpitt AR. (2001): Early events in naphthalene-induced acute Clara cell toxicity. II. Comparison of glutathione depletion and histopathology by airway location. In: *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2001 Mar;24(3):272-81.

Rawlins EL, Ostrowski LE, Randell SH, Hogan BL. (2007): Lung development and repair: contribution of the ciliated lineage. In: *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Jan 9;104(2):410-7. Epub 2006 Dec 28.

Reynolds SD, Giangreco A, Power JH, Stripp BR. (2000): Neuroepithelial bodies of pulmonary airways serve as a reservoir of progenitor cells capable of epithelial regeneration. In: *Am J Pathol.* 2000 Jan;156(1):269-78.

Reynolds SD, Malkinson AM. (2010): Clara cell: progenitor for the bronchiolar epithelium. In: *Int J Biochem Cell Biol.* 2010 Jan;42(1):1-4. doi: 10.1016/j.biocel.2009.09.002. Epub 2009 Sep 9.

Rock JR, Onaitis MW, Rawlins EL, Lu Y, Clark CP, Xue Y, Randell SH, Hogan BL. (2009): Basal cells as stem cells of the mouse trachea and human airway epithelium. In: *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Aug 4;106(31):12771-5. doi: 10.1073/pnas.0906850106. Epub 2009 Jul 22.

Sanchez T, Welch D, Nicastro D, Dogic Z. (2011): Cilia-like beating of active microtubule bundles. In: *Science.* 2011 Jul 22;333(6041):456-9. doi: 10.1126/science.1203963.

Sha Q, Truong-Tran AQ, Plitt JR, Beck LA, Schleimer RP. (2004): Activation of airway epithelial cells by toll-like receptor agonists. In: *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2004 Sep;31(3):358-64. Epub 2004 Jun 10.

Shaykhiev R, Behr J, Bals R. (2008): Microbial patterns signaling via Toll-like receptors 2 and 5 contribute to epithelial repair, growth and survival. In: *PLoS One.* 2008 Jan 2;3(1):e1393. doi: 10.1371/journal.pone.0001393.

Shultz MA, Choudary PV, Buckpitt AR. (1999): Role of murine cytochrome P-450 2F2 in metabolic activation of naphthalene and metabolism of other xenobiotics. In: *J Pharmacol Exp Ther.* 1999 Jul;290(1):281-8.

Singh G, Katyal SL, Brown WE, Kennedy AL, Singh U, Wong-Chong ML. (1990): Clara cell 10 kDa protein (CC10): comparison of structure and function to uteroglobin. In: *Biochim Biophys Acta.* 1990 Jul 6;1039(3):348-55.

Singh G, Katyal SL. (1997): Clara cells and Clara cell 10 kD protein (CC10). In: *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1997 Aug;17(2):141-3.

Stohs SJ, Ohia S, Bagchi D. (2002): Naphthalene toxicity and antioxidant nutrients. In: *Toxicology.* 2002 Oct 30;180(1):97-105.

Stripp BR, Huffman JA, Bohinski RJ. (1994): Structure and regulation of the murine Clara cell secretory protein gene. In: *Genomics.* 1994 Mar 1;20(1):27-35.

Stripp BR, Maxson K, Mera R, Singh G. (1995): Plasticity of airway cell proliferation and gene expression after acute naphthalene injury. In: *Am J Physiol.* 1995 Dec;269(6 Pt 1):L791-9.

Strutt D. (2003): Frizzled signalling and cell polarisation in *Drosophila* and vertebrates. In: *Development.* 2003 Oct;130(19):4501-13.

Strutt DI, Weber U, Mlodzik M. (1997): The role of RhoA in tissue polarity and Frizzled signalling. In: *Nature.* 1997 May 15;387(6630):292-5.

Sutherland KM, Edwards PC, Combs TJ, Van Winkle LS. (2011): Sex differences in the development of airway epithelial tolerance to naphthalene. In: *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2012 Jan 1;302(1):L68-81. doi: 10.1152/ajplung.00089.2011. Epub 2011 Oct 14.

Takeda K, Kaisho T, Akira S. (2003): Toll-like receptors. In: *Annu Rev Immunol.* 2003;21:335-76. Epub 2001 Dec 19.

Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, Takeda K, Akira S. (1999): Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. In: *Immunity.* 1999 Oct;11(4):443-51.

- Tam A, Wadsworth S, Dorscheid D, Man SF, Sin DD. (2011): The airway epithelium: more than just a structural barrier. In: *Theor Adv Respir Dis*. 2011 Aug;5(4):255-73. doi: 10.1177/1753465810396539. Epub 2011 Mar 3.
- Van Winkle LS, Buckpitt AR, Nishio SJ, Isaac JM, Plopper CG. (1995): Cellular response in naphthalene-induced Clara cell injury and bronchiolar epithelial repair in mice. In: *Am J Physiol*. 1995 Dec;269(6 Pt 1):L800-18.
- Van Winkle LS, Gunderson AD, Shimizu JA, Baker GL, Brown CD. (2002): Gender differences in naphthalene metabolism and naphthalene-induced acute lung injury. In: *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002 May;282(5):L1122-34.
- Van Winkle LS, Isaac JM, Plopper CG. (1997): Distribution of epidermal growth factor receptor and ligands during bronchiolar epithelial repair from naphthalene-induced Clara cell injury in the mouse. In: *Am J Pathol*. 1997 Aug;151(2):443-59.
- Vareille M, Kieninger E, Edwards MR, Regamey N. (2011): The airway epithelium: soldier in the fight against respiratory viruses. In: *Clin Microbiol Rev*. 2011 Jan;24(1):210-29. doi: 10.1128/CMR.00014-10.
- Veeman MT, Axelrod JD, Moon RT. (2003): A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling. In: *Dev Cell*. 2003 Sep;5(3):367-77.
- Wang C, Deng L, Hong M, Akkaraju GR, Inoue J, Chen ZJ. (2001): TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. In: *Nature*. 2001 Jul 19;412(6844):346-51.
- Wang H, Liu Y, Liu Z. (2013): Clara cell 10-kD protein in inflammatory upper airway diseases. In: *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2013 Feb;13(1):25-30. doi: 10.1097/ACI.0b013e32835a5b35.
- Wang Y, Chang H, Nathans J. (2010): When whorls collide: the development of hair patterns in frizzled 6 mutant mice. In: *Development*. 2010 Dec;137(23):4091-9. doi: 10.1242/dev.057455.
- Wanner A, Salathé M, O'Riordan TG. (1996): Mucociliary clearance in the airways. In: *Am J Respir Crit Care Med*. 1996 Dec;154(6 Pt 1):1868-902.

Wasano K, Yamamoto T. (1989): Rat lung 29 kD beta-galactoside-binding lectin is secreted by bronchiolar Clara cells into airways. In: *Histochemistry*. 1989;90(6):447-51.

Yang RB, Mark MR, Gray A, Huang A, Xie MH, Zhang M, Goddard A, Wood WI, Gurney AL, Godowski PJ. (1998): Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. In: *Nature*. 1998 Sep 17;395(6699):284-8.

Yang H, Young DW, Gusovsky F, Chow JC. (2000): Cellular events mediated by lipopolysaccharide-stimulated toll-like receptor 4. MD-2 is required for activation of mitogen-activated protein kinases and Elk-1. In: *J Biol Chem*. 2000 Jul 7;275(27):20861-6.

Yildirim AO, Veith M, Rausch T, Müller B, Kilb P, Van Winkle LS, Fehrenbach H. (2008): Keratinocyte growth factor protects against Clara cell injury induced by naphthalene. In: *Eur Respir J*. 2008 Sep;32(3):694-704. doi: 10.1183/09031936.00155107. Epub 2008 Apr 2.

You Y, Huang T, Richer EJ, Schmidt JE, Zabner J, Borok Z, Brody SL. (2004): Role of f-box factor foxj1 in differentiation of ciliated airway epithelial cells. In: *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004 Apr;286(4):L650-7. Epub 2003 Jun 20.

Yu X, Ng CP, Habacher H, Roy S. (2008): Foxj1 transcription factors are master regulators of the motile ciliogenic program. In: *Nat Genet*. 2008 Dec;40(12):1445-53. doi: 10.1038/ng.263. Epub 2008 Nov 16.

Zallen JA. (2007): Planar polarity and tissue morphogenesis. In: *Cell*. 2007 Jun 15;129(6):1051-63.

8 Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen bedanken, die mich während der Promotionszeit unterstützt und so zum Gelingen der Dissertation beigetragen haben.

Bei Prof. Dr. med. Peter König möchte ich mich besonders bedanken. Ich danke Ihm für die Bereitstellung des interessanten Themas, der Betreuung und seiner Unterstützung in jeglicher Hinsicht sowie seiner Geduld während des Schreibens der Dissertation. Auch wenn ich es nie für möglich gehalten habe, du hattest recht: am Ende wird alles gut!

Prof. Dr. med. Jürgen Westermann möchte ich an dieser Stelle für seine hilfreichen Anmerkungen danken.

Bei den Mitarbeitern des Instituts, insbesondere der AG König möchte ich mich ebenfalls bedanken, die immer ein offenes Ohr hatten und mir bei jeglichen Problemen mit Rat und Tat zur Seite standen und somit zur Problemlösung beigetragen haben.

Besonderer Dank gilt Kathy Budler und Gudrun Knebel für die Hilfe bei jeglichen Fragen neuer Methoden und die Unterstützung im Labor. Ihr seid die gute Fee im Labor.

Ich danke meinen Pilatesmädeln und –junge für die anstrengend und doch immer wieder lustigen Turnstunden, die mir Kraft und Ruhe gegeben haben, um wieder gelassen ans Werk zu gehen.

Ebenfalls danke ich Ann-Christin, Johanna, Carina, Ina, Tina, Eva, Navina, Saskia, Helge, Hilke, Mailin, Mila, Ben, Sven, Nicole (ich hoffe, ich haben niemanden vergessen!) für die viele Kraft, Energie, Ruhe, Entspannung, das herzhafte Lachen, Mut machen und aufmuntern. Danke für eure offenen Ohren. Ihr habt mich in einer schwierigen Phase ertragen und mich immer wieder auf die Beine geholt, unterstützt und an mich geglaubt. Leider sind unsere „Meetings“ viel zu kurz gekommen. Vielen Dank für Alles, Ihr seid großartig!

DANKE!

Erklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe und keine weiteren als die darin angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Ich habe diese Arbeit weder in gleicher noch in ähnlicher Form an anderer Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt und habe zuvor keine anderen Promotionsversuche unternommen.

Kristin Döring

Lübeck, 2014