

Aus dem Institut für Anatomie und  
dem Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene  
der Universität zu Lübeck  
Direktoren: Prof. Dr. Jürgen Westermann und Prof. Dr. Werner Solbach

---

**Interaktion zwischen gesundem Atemwegsepithel  
und Bakterien – zilienvermittelter Transport,  
Anheftung und Signaltransduktion**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck  
- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von  
Saskia Bermbach  
aus Mainz

Lübeck 2012

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Peter König
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Christoph Härtel
3. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Wolfgang Kummer
Tag der mündlichen Prüfung:	08.12.2014
Zum Druck genehmigt. Lübeck, den	08.12.2014
Promotionskommission der Sektion Medizin	

Meinen Eltern

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>iv</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>v</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>vii</b>
<b>1 Einleitung und Fragestellung</b>	<b>1</b>
1.1 Aufbau und Funktion des Trachealepithels . . . . .	1
1.1.1 Nicht-zilientragende Zellen . . . . .	2
1.1.2 Zilientragende Zellen . . . . .	2
1.1.3 Zilienschlag . . . . .	3
1.1.4 Mukoziliäre Clearance . . . . .	5
1.2 Immunabwehr in der Trachea . . . . .	7
1.2.1 Barrierefunktion . . . . .	7
1.2.2 Inflammatorische Reaktionen in den Epithelzellen nach Pathogenerkennung . . . . .	8
1.2.3 Nachweis der initialen Entzündungsreaktion in Epithelzellen . . . . .	10
1.2.4 Immunreaktion in der murinen ex-vivo Trachea . . . . .	11
1.3 Entstehung von Infektionen . . . . .	11
1.4 Fragestellung . . . . .	12
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>13</b>
2.1 Tiertötungsgenehmigung . . . . .	13
2.2 Versuchstiere . . . . .	13
2.3 Präparation der Trachea . . . . .	13
2.4 Messung des zilienvermittelten Transports . . . . .	14
2.4.1 Ermittlung der Transportgeschwindigkeit . . . . .	15
2.4.2 Transportgeschwindigkeit von Polystyrenpartikeln . . . . .	16
2.4.3 Transportgeschwindigkeit von Fluoresbrite-Partikeln . . . . .	17
2.4.4 Transportgeschwindigkeit von Bakterien . . . . .	17
2.4.5 Transportgeschwindigkeit in Abhängigkeit vom Abstand zum Epithel . . . . .	18
2.4.6 Diskontinuität der Transportgeschwindigkeit . . . . .	18
2.5 Ermittlung der Zilienschlagfrequenz in Abhängigkeit von der Temperatur . . . . .	19
2.6 Stimulation von Epithelzellen . . . . .	20

2.6.1	Lipopolysaccharid (LPS) . . . . .	20
2.6.2	<i>Staphylokokkus aureus</i> ( <i>S. aureus</i> ) . . . . .	20
2.6.3	<i>Haemophilus influenzae</i> ( <i>H. influenzae</i> ) . . . . .	21
2.6.4	Pam3Cys . . . . .	21
2.6.5	Abhängigkeit der NF $\kappa$ B-Translokation und der mRNA-Regulation vom MyD88-Inhibitor . . . . .	21
2.7	Neue Methode zur Epithelzellgewinnung . . . . .	22
2.8	Epithelgewinnung zur Durchführung der qRT-PCR . . . . .	23
2.9	Vorbereitung und Durchführung der qRT-PCR . . . . .	23
2.9.1	RNA-Isolation . . . . .	23
2.9.2	Reverse Transkription . . . . .	24
2.9.3	qRT-PCR . . . . .	24
2.10	Indirekte Immunhistochemie . . . . .	24
2.11	Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung . . . . .	25
2.12	Statistische Auswertung . . . . .	26
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> . . . . .	<b>27</b>
3.1	Transport von Partikeln und Bakterien . . . . .	27
3.1.1	Transport von Polystyrenpartikeln . . . . .	27
3.1.1.1	Veränderung der Transportgeschwindigkeit mit zunehmendem Abstand zum Epithel . . . . .	28
3.1.1.2	Diskontinuität der Transportgeschwindigkeit . . . . .	30
3.1.1.3	Grenzen des zilienvermittelten Transports . . . . .	31
3.1.2	Transport von Bakterien . . . . .	32
3.1.3	Transport von Fluoresbrite-Partikeln . . . . .	34
3.1.3.1	Mukusfäden . . . . .	34
3.1.3.2	Vergleich der Transportgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Partikelgröße: Dynabeads und Fluoresbrite . . . . .	36
3.2	Translokation des NF $\kappa$ B p65 in den Zellkern . . . . .	36
3.2.1	Inkubation mit <i>H. influenzae</i> . . . . .	36
3.2.2	Inkubation mit LPS . . . . .	39
3.3	Evaluierung des neuen Verfahrens zur Epithelzellgewinnung . . . . .	41
3.4	Nachweis der Regulation von Cytokin- und Chemokin-mRNA . . . . .	41
3.4.1	Stimulation mit LPS . . . . .	41
3.4.2	Stimulation mit <i>H. influenzae</i> . . . . .	42
3.4.3	Stimulation mit <i>S. aureus</i> . . . . .	43
3.4.4	Stimulation mit Toll-like-Rezeptor-2-Agonist Pam3Cys . . . . .	43
3.5	MyD88-Inhibitor: Wirkung auf NF $\kappa$ B-Translokation und Cytokin-/Chemokin-mRNA . . . . .	44
3.5.1	Translokation von NF $\kappa$ B p65 in den Zellkern . . . . .	44
3.5.2	Nachweis der Regulation von Cytokin- und Chemokin-mRNA . . . . .	46

---

3.6	Zellfunktionen in Abhängigkeit von der Temperatur . . . . .	47
3.6.1	Temperaturabhängigkeit der Zilienschlagfrequenz . . . . .	47
3.6.2	Temperaturabhängigkeit der Produktion von Cytokin- und Chemokin- mRNA . . . . .	50
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>51</b>
4.1	Mechanismen des zilienvermittelten Transports . . . . .	51
4.1.1	Bedeutung von Mukus und genauer Regulation der periziliären Flüssigkeit . . . . .	51
4.1.2	Transport durch direkten Kontakt mit Zilien . . . . .	53
4.1.3	Transport durch Flüssigkeitsströmung . . . . .	54
4.1.4	Grenzen des zilienvermittelten Transports . . . . .	57
4.2	Nachweis der epithelialen Entzündungskaskade . . . . .	59
4.2.1	Stimulation mit Bakterien . . . . .	60
4.2.2	Stimulation mit LPS . . . . .	63
4.3	Einfluss der Temperatur auf Zilienschlagfrequenz und Entzündungskaskade .	66
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>68</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>70</b>
	<b>Anhang:</b>	<b>79</b>
<b>A</b>	<b>Berechnung der Reynoldszahlen</b>	<b>80</b>
<b>B</b>	<b>Primer für die qRT-PCR</b>	<b>82</b>
<b>C</b>	<b>Verzeichnis der verwendeten Filme</b>	<b>83</b>
<b>D</b>	<b>Erklärung</b>	<b>84</b>
<b>E</b>	<b>Danksagung</b>	<b>85</b>
<b>F</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>86</b>
<b>G</b>	<b>Eigene Arbeiten</b>	<b>87</b>

# Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
CD14	cluster of differentiation 14
CXCL5	CXC-Motiv-Chemokin 5
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Foxj1	Forkhead-Box-Protein J1
I $\kappa$ B	Inhibitor des $\kappa$ B
Ig	Immunglobulin
IL6	Interleukin 6
KC	Keratinocyten-abgeleitetes Chemokin
LBP	Lipopolysaccharid-bindendes Protein
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	Leucin-reiche Wiederholungen
LTA	Lipoteichonsäure
MCP-1	Monozyten-chemotaktisches Protein 1
MD-2	Lymphozytenantigen 96
MIP-2	Makrophagen-inflammatorisches Protein 2
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MyD88	myeloider Differenzierungsfaktor 88
NF $\kappa$ B	nukleärer Faktor $\kappa$ B
PAMP	pathogen associated molecular pattern
PFA	Paraformaldehyd
PRR	pattern recognition receptor
qRT-PCR	quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion
TBS	Tris-buffered Saline
TIR	Toll-IL1-Rezeptor-Domäne
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor $\alpha$
TRIF	TIR-Domäne-enthaltender Adapter-induzierendes Interferon- $\beta$

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Rasterelektronenmikroskopisches Bild des trachealen Atemwegsepithels der Maus . . . . .	2
1.2	Schematischer Aufbau eines Kinoziliums . . . . .	3
1.3	Schematischer Ablauf eines Zilienschlags nach Sleigh et al. (1988) . . . . .	4
1.4	Vorherrschende Theorie der mukoziliären Clearance . . . . .	6
1.5	TLR4- und TLR2-vermittelte Immunkaskade mit konsekutiver Produktion proinflammatorischer Mediatoren . . . . .	9
2.1	Blick auf eröffneten Thorax der Maus, Trachea in beheizter Kulturschale und Gesamt-Setup . . . . .	14
2.2	Ermittlung der Transportgeschwindigkeit von Partikeln . . . . .	16
2.3	Unterschied der Zilienschlagfrequenz zwischen benachbarten und nicht benachbarten zilientragenden Zellen . . . . .	19
3.1	Transport von Polystyrenpartikeln . . . . .	27
3.2	Transport von Polystyrenpartikeln in und außerhalb eines Mukusstücks . . . . .	28
3.3	Veränderung der Transportgeschwindigkeit mit zunehmendem Abstand zum Epithel . . . . .	29
3.4	Abnahme der prozentualen Transportgeschwindigkeit von Dynabeads bei Entfernung vom Epithel . . . . .	29
3.5	Variabilität der Transportgeschwindigkeit eines einzelnen Polystyrenpartikels . . . . .	30
3.6	Variationsbreite der einzelnen Transportgeschwindigkeiten eines Dynabeads bezogen auf deren Mittelwert . . . . .	31
3.7	Direkter zilienvermittelter Transport von Polystyrenpartikeln . . . . .	31
3.8	Grenzen des zilienvermittelten Transports . . . . .	32
3.9	Transport von Dynabeads und Bakterien trotz Entfernung von Mukus . . . . .	33
3.10	Transportgeschwindigkeit von Dynabeads und Bakterien . . . . .	33
3.11	Bilderfolge von an Zilien klebenden Bakterien . . . . .	34
3.12	Anheftungsverhalten von Fluoresbrite-Partikeln an murinem Trachealepithel . . . . .	35
3.13	Mukusfaden . . . . .	35
3.14	Transportgeschwindigkeit von Dynabeads und Fluoresbrite . . . . .	36
3.15	Stimulation einer ex-vivo Trachea mit <i>H. influenzae</i> . . . . .	37
3.16	Verhältnis von Kernen mit NF $\kappa$ B p65-Translokation in den Zellkern zur Gesamtzahl an Zellkernen nach <i>H. influenzae</i> -Stimulation . . . . .	37

3.17 Translokation von NF $\kappa$ B p65 in den Zellkern nach Stimulation mit <i>H. influenzae</i> in nicht-zilientragenden Zellen . . . . .	38
3.18 Stimulation einer ex-vivo Trachea mit LPS . . . . .	39
3.19 Verhältnis von Kernen mit NF $\kappa$ B p65-Translokation in den Zellkern zur Gesamtzahl an Zellkernen nach LPS-Stimulation . . . . .	40
3.20 Translokation von NF $\kappa$ B p65 in den Zellkern nach Stimulation mit LPS in nicht-zilientragenden Zellen . . . . .	40
3.21 REM-Bild: Blick auf eine murine Trachea nach Abstrich mit Öse und Tupfern .	41
3.22 Veränderung der mRNA-Menge an Cytokinen und Chemokinen nach LPS-Stimulation . . . . .	42
3.23 Veränderung der mRNA-Menge an Cytokinen und Chemokinen nach <i>H. influenzae</i> -Stimulation . . . . .	42
3.24 Veränderung der mRNA-Menge an Cytokinen und Chemokinen nach <i>S. aureus</i> -Stimulation . . . . .	43
3.25 Veränderung der mRNA-Menge an Cytokinen und Chemokinen nach Pam3-Cys-Stimulation . . . . .	44
3.26 Hemmung der Translokation von NF $\kappa$ B p65 in den Zellkern durch den MyD88-Inhibitor . . . . .	45
3.27 Verhältnis von Kernen mit NF $\kappa$ B p65-Translokation in den Zellkern zur Gesamtzahl an Zellkernen . . . . .	46
3.28 Veränderung der mRNA-Menge an Cytokinen und Chemokinen nach Inkubation mit dem MyD88-Inhibitor und LPS . . . . .	47
3.29 Veränderung der Zilienschlagfrequenz über verschiedene Temperaturstufen .	48
3.30 Temperaturabhängigkeit der maximalen Zilienschlagfrequenz der einzelnen zilientragenden Zellen . . . . .	48
3.31 Prozentuale Übereinstimmung der Zilienschlagfrequenz zwischen benachbarten und nicht benachbarten zilientragenden Zellen . . . . .	49
3.32 Veränderung der mRNA-Menge an Cytokinen und Chemokinen nach <i>H. influenzae</i> bei 24 °C bzw. 37 °C . . . . .	50
4.1 Zilienvermittelter Transport von Polystyrenpartikeln . . . . .	55
4.2 Transport von Polystyrenpartikeln durch Flüssigkeitsströmung . . . . .	57

# Tabellenverzeichnis

2.1	Übersicht über die Proben des Versuchs mit dem MyD88-Inhibitor und LPS .	22
B.1	Primer für die qRT-PCR . . . . .	82
C.1	Verzeichnis der für die Abbildungen verwendeten Filme auf der DVD . . . . .	83

# 1 Einleitung und Fragestellung

Jeden Tag atmet der Mensch fast 12.000 l Luft ein, die mit einer über 100 m<sup>2</sup> großen Oberfläche im Körper Kontakt hat (Silbernagl und Despopoulos, 2012). Diese Luft ist keinesfalls steril, sondern mit Bakterien, Viren und Partikeln, wie z. B. Feinstaub, angereichert. Trotzdem ist der Körper über eigene Abwehrmechanismen imstande, die Fremdkörper zuverlässig zu bekämpfen bzw. herauszutransportieren. Gelegentlich gelingt es dennoch, dieses Abwehrsystem zu überwinden, mit der Konsequenz, dass eine Infektion ausgelöst wird. Um nachvollziehen zu können, warum es dazu kommt, muss man das Gesamtsystem verstehen. Dafür fanden in der vorliegenden Arbeit Versuche an Tracheen der Maus statt, da diese vom Aufbau her humanen Bronchien sehr ähneln (Pack et al., 1980; Kretschmer, 2012). Es wurde die Interaktion zwischen gesundem Atemwegsepithel und Bakterien untersucht, wobei ein besonderes Augenmerk dem zilienvermittelten Transport, der Anheftung und der Signaltransduktion galt.

## 1.1 Aufbau und Funktion des Trachealepithels

Die Trachea bildet bei Säugetieren zusammen mit dem Larynx den proximalen Teil des unteren Respirationstrakts und stellt damit die Verbindung zum oberen Respirationstrakt dar. Sie ist mit einem mehrreihigen, hochprismatischen Epithel ausgekleidet. Die Zellen dieser Epithelschicht lassen sich in zilientragende und nicht-zilientragende Zellen unterteilen (s. Abb. 1.1, nächste Seite). Die Zellen des Trachealepithels treten nicht in direkten Kontakt mit der Luft in den Atemwegen. Eine zweilagige Flüssigkeitsschicht trennt Epithel und Luft voneinander. Nach bisheriger Theorie umgibt eine Muzin-freie Schicht die Zilien, die sog. periziliäre Flüssigkeit. Die zweite Schicht enthält viele Muzine, heißt dementsprechend Mukus und schwimmt auf der periziliären Flüssigkeit oberhalb der Zilien. Diese beiden Schichten bilden zusammen mit den Epithelzellen der Trachea das System der mukoziliären Clearance (s. Kap. 1.1.4). Aktuell haben Button et al. (2012) eine neue Theorie aufgestellt. Sie postulieren, dass die periziliäre Flüssigkeit ebenfalls bestimmte Muzine und Mukopolysaccharide enthält, die ein Netz um die Zilien bauen und so verhindern, dass Mukus und Partikel zwischen die Zilien gelangen können.

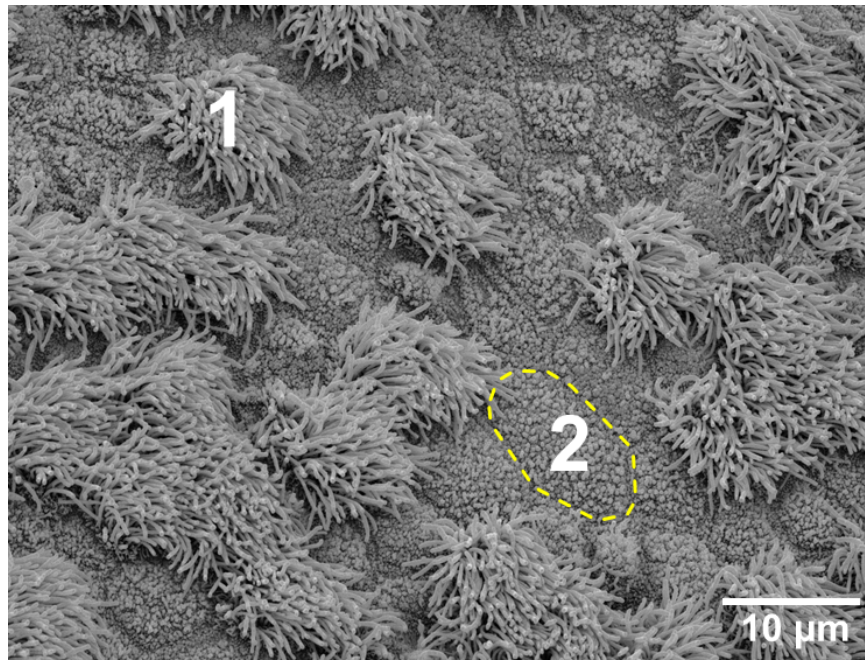


Abbildung 1.1: Rasterelektronenmikroskopisches Bild (REM-Bild) des trachealen Atemwegsepithels der Maus von luminal. (1) entspricht einer zilientragenden Zelle, (2) einer nicht-zilientragenden Zelle.

### 1.1.1 Nicht-zilientragende Zellen

Nicht-zilientragende Zellen machen bei Mäusen, den Versuchstieren in der vorliegenden Arbeit, etwa 65 % der Zellen innerhalb des Epithelverbundes aus (Pack et al., 1980). Zu diesen Zellen gehören Basalzellen, die auf der Basalmembran sitzen und keinen Kontakt zum Lumen haben. Aus ihnen differenzieren sich die verschiedenen Zelltypen. Sie stellen somit die Regenerationsreserve des Epithels dar (Wanner et al., 1996). Neben diesen Zellen sind drei weitere nicht-zilientragende Zellarten bekannt, die auf der Basalmembran sitzen und bis in das Lumen der Trachea reichen. Zu ihnen zählen (a) sekretorische Zellen, (b) endokrine Zellen und (c) Bürstenzellen. Den größten Anteil der nicht-zilientragenden Zellen machen dabei sekretorische Zellen und Basalzellen aus. Endokrine Zellen und Bürstenzellen stellen nur einen geringen Anteil.

### 1.1.2 Zilientragende Zellen

Zilientragende Zellen sitzen auf der Basalmembran und reichen in das Lumen der Trachea. Sie besitzen auf ihrer Oberfläche jeweils etwa 200 Kinozilien mit einer durchschnittlichen Länge von  $6\ \mu\text{m}$  und einem Durchmesser von  $0,1$  bis  $0,2\ \mu\text{m}$  (Wanner et al., 1996). Kinozilien sind aus Mikrotubuli aufgebaut. Jeder einzelne Mikrotubulus ist ein Heterodimer aus  $\alpha$ -Tubulin,  $\beta$ -Tubulin und stabilisierenden Begleitproteinen. Diese Mikrotubuli bilden komplette A-Tubuli und inkomplette B-Tubuli, die durch Tektine untereinander verbunden sind (Linck

et al., 1985). Die Anordnung in einer Zilie erfolgt in der „ $9 \times 2 + 2$ “-Struktur (s. Abb. 1.2). Dabei bilden neun Mikrotubulus-Doubletten, die jeweils aus einem A-Tubulus und einem B-Tubulus bestehen, einen äußeren Ring. In dessen Mitte sind zwei Zentraltubuli miteinander verbunden und bilden den Rest der „ $9 \times 2 + 2$ “-Struktur (Mizuno et al., 2012). *Radial spokes* verbinden sowohl die äußeren neun Mikrotubulus-Doubletten miteinander als auch in radiärer Anordnung die äußeren mit den inneren Mikrotubuli (Luck, 1984).

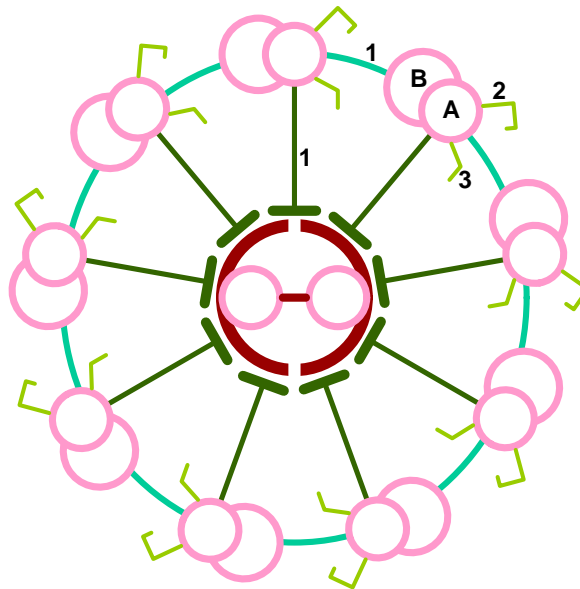


Abbildung 1.2: Schematischer Aufbau eines Kinoziliums. (A) bezeichnet einen kompletten A-Tubulus, (B) den inkompletten B-Tubulus. (1) stellt *radial spokes* dar, die sowohl die äußeren Doubletten untereinander als auch die äußeren mit den inneren Doubletten verbinden. (2) ist der äußere Dyneinarm und (3) der innere Dyneinarm, die zusammen für die Bewegung der Zilien von entscheidender Bedeutung sind.

Kinozilien wachsen aus dem Kinetosom und bleiben dort auch verankert (Lüllmann-Rauch und Paulsen, 2012). Dieses Kinetosom besteht aus neun Mikrotubulus-Tripletts, jedes dieser Tripletts wiederum aus einem kompletten und zwei inkompletten Tubuli (Lüllmann-Rauch und Paulsen, 2012). Die Bewegung eines Kinoziliums entsteht durch Verschieben benachbarter Mikrotubulus-Doubletten gegeneinander. Jeder A-Tubulus des äußeren Rings einer Kinozilie verfügt sowohl über einen inneren als auch einen äußeren Dyneinarm (Lüllmann-Rauch und Paulsen, 2012), die zusammen für den Zilienschlag verantwortlich sind.

### 1.1.3 Zilienschlag

Die Interaktion der inneren und äußeren Dyneinarme in den Kinozilien verursacht den Zilienschlag. Unter Spaltung von Adenosintriphosphat (ATP) gleiten diese Dyneinarme am B-Tubulus der benachbarten Mikrotubulus-Doublette Richtung Basis entlang. Aufgrund der Verankerung der Doubletten am Kinetosom erfolgt keine Gleitbewegung, sondern eine Verbiegung des Ziliums (Lüllmann-Rauch und Paulsen, 2012). Dieser Ablauf findet abwech-

selnd in der einen bzw. der anderen Hälfte der Zilie statt, so dass die charakteristische schnelle Vorwärtsbewegung (*effective stroke*) und die langsamere Rückstellbewegung (*recovery stroke*) entstehen (Lüllmann-Rauch und Paulsen, 2012). An jedem Kinetosom gibt es einen Fuß, der mit seinem verjüngten Ende in Richtung des *effective stroke* zeigt (Gibbons, 1961). Die Füße aller Kinetosomen einer Zelle zeigen etwa in dieselbe Richtung, so dass die Zilien einer Zelle dadurch ebenfalls alle in eine Richtung schlagen (Holley und Afzelius, 1986).

Neben dem *effective* und dem *recovery stroke* kommt es während eines Zilienschlags noch zu einer Ruhephase. Die Reihenfolge ist dabei immer (a) *effective stroke*, (b) *resting phase*, (c) *recovery stroke*, um danach gleich wieder in den nächsten *effective stroke* überzugehen (Wanner et al., 1996). Im *effective stroke* sind nach Sleigh et al. (1988) und Wanner et al. (1996) die Zilien vollständig ausgestreckt und beginnen mit dem Schlag nahezu senkrecht zur Zelloberfläche (s. Abb. 1.3, Nr. 2 und 4). Während des Schlages beschreiben sie einen Winkel von etwa  $110^\circ$  und transportieren dabei Mukus (Wanner et al., 1996). Nach kurzer Ruhephase erfolgt der *recovery stroke*. Dabei bewegen sich die Zilien in verkürztem Zustand etwa  $180^\circ$  mit Tendenz nach rechts (auf die Richtung des *effective stroke* bezogen, s. Abb. 1.3, Nr. 1 und 3) in ihre Ausgangsposition (Wanner et al., 1996). Die Verkürzung der Zilien hat die Funktion, den im *effective stroke* beförderten Mukus nicht wieder zurückzubewegen. Die Geschwindigkeit des *effective stroke* ist etwa dreimal höher als die Geschwindigkeit des *recovery stroke* (Wilson et al., 1975).

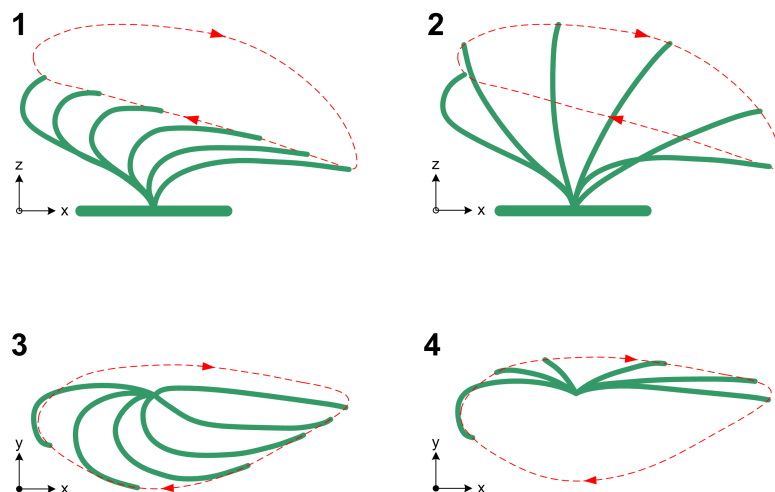


Abbildung 1.3: Schematischer Ablauf eines Zilienschlags nach Sleigh et al. (1988). Die Bilder 1 und 2 zeigen das Kinozilium von der Seite und die Bilder 3 und 4 von oben. Die Bilder 1 und 3 stellen den langsamen *recovery stroke* dar, die Bilder 2 und 4 den schnellen *effective stroke*. Die gestrichelte rote Linie demonstriert den gesamten Bewegungsablauf.

Bei Erhöhen der Zilienschlagfrequenz werden alle drei Phasen verkürzt, insbesondere aber die Ruhephase und der *recovery stroke* (Sanderson und Dirksen, 1985). Um einen Trans-

port über die Trachea aufzubauen, müssen nicht nur die Zilien einer Zelle koordiniert werden, sondern auch die Zellen der Umgebung. In der Trachea liegt physiologisch eine metachronale Welle<sup>1</sup> vor (Wanner et al., 1996). Welche Faktoren zum Entstehen dieser Welle beitragen, ist noch relativ unklar, man vermutet u. a. einfache mechanische Phänomene. Die Theorie ist, dass Zilien bei Verlassen der Ruhephase und Übergang in den *recovery stroke* umgebende, ruhende Zilien berühren und diese dadurch anregen, zeitlich versetzt, auch in den *recovery stroke* überzugehen (Gheber und Priel, 1990). Da die Koordination zwischen den zilientragenden Zellen nach Gheber und Priel (1989) auch über Gebiete mit großen Lücken hinweg funktioniert, muss es noch andere Mechanismen für die Synchronisierung geben, die aber bisher weitgehend unerforscht sind.

Die Zilien in der murinen Trachea schlagen unter Ruhebedingungen ex-vivo mit einer Frequenz von ca. 10 - 12 Hz (König et al., 2009; Simet et al., 2010). Beim Menschen können sie eine Beförderungsgeschwindigkeit von etwa 4 - 20 mm/min erreichen (Wanner et al., 1996). Bei Abnahme der Temperatur verringert sich die Schlagfrequenz (Green et al., 1995), bei Temperaturanstieg und/oder Zugabe bestimmter Stoffe (z. B. ATP, Serotonin) erhöht sich diese (Morse et al., 2001; König et al., 2009; Zhao et al., 2012).

#### 1.1.4 Mukoziliäre Clearance

Bei jedem Atemzug werden Pathogene, Staub und andere Fremdstoffe eingeatmet. Damit sie nicht in den Atemwegen liegenbleiben, weder passiv noch aktiv schaden, müssen sie wieder herausbefördert werden. Diese Aufgabe erfüllt das System der mukoziliären Clearance (Knowles und Boucher, 2002).

Wie schon oben beschrieben, bilden die Zellen des Trachealepithels und ihre produzierten Substanzen, Flüssigkeit und Muzine, eine Einheit. Die Epithelzellen sind die Basis des Systems, darauf befinden sich die zwei Flüssigkeitsschichten mit unterschiedlicher Viskosität. Die untere der beiden Schichten, die weniger visköse, stellt den Bewegungsraum der Zilien dar (Wanner et al., 1996). Die obere Schicht mit der vom Hydratationszustand abhängigen Viskosität entspricht dem Transportmedium. In diesem werden Pathogene, Fremdstoffe und Detritus mechanisch und chemisch gebunden (Murphy et al., 2008a). Über den bereits beschriebenen Zilienschlag (s. Kap. 1.1.3) werden die in Mukus gebundenen Partikel in Richtung Larynx transportiert. Dort angekommen, werden sie entweder verschluckt oder durch Husten und Ausspucken ausgeschieden (Wanner et al., 1996). Um Partikel so eliminieren zu können, muss nach vorherrschender Theorie Mukus vorhanden sein. Wenn es nur periziliäre Flüssigkeit gibt, findet nach Meinung von Matsui et al. (1998) sowie Knowles und Boucher (2002) kein Transport statt. Ihrer Meinung nach wird lediglich Mukus transportiert, die periziliäre Flüssigkeit jedoch nur sekundär mitbewegt (s. Abb. 1.4, nächste Seite).

---

<sup>1</sup>vergleichbar mit einer sog. La-Ola-Welle, wie z. B. im Fußballstadion

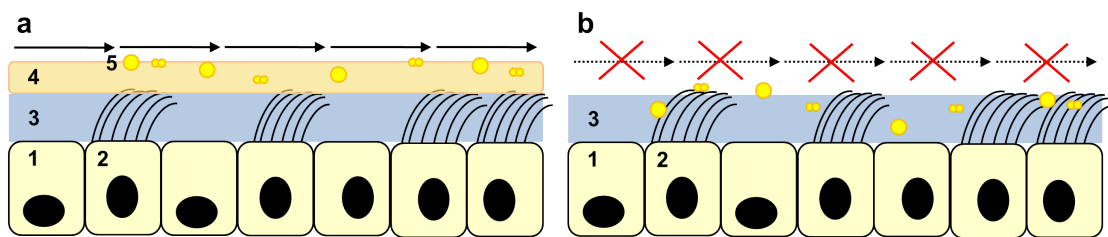


Abbildung 1.4: Vorherrschende Theorie der mukoziliären Clearance (Matsui et al., 1998; Knowles und Boucher, 2002). Nicht-zilientragende (1) und zilientragende (2) Zellen bilden das Epithel. (a) Mukus (4) schwimmt auf der periziliären Flüssigkeit (3) und wird durch die Zilien bewegt. Am Mukus haften Partikel und Bakterien (5), die in Richtung Larynx transportiert werden. (b) Nach Entfernung des Mukus bricht nach dieser Theorie der Transport zusammen, da die Zilien primär den Mukus und nur sekundär die periziliäre Flüssigkeit bewegen.

Nach bisherigem Stand der Forschung muss die periziliäre Flüssigkeit über eine ganz bestimmte Schichtdicke verfügen, um einen Transport von Partikeln zu gewährleisten (Widdicombe und Widdicombe, 1995). Diese Schicht beträgt etwa 6-7  $\mu\text{m}$ , ist also gerade so dick, dass die Zilien in ihr die Bewegung ausführen können, gleichzeitig mit ihren Spitzen aber noch die auf ihr schwimmende Muzinschicht erreichen und diese in Richtung Larynx transportieren (Tarran et al., 2001a; Leopold et al., 2009). Wenn zu viel Flüssigkeit vorhanden ist, kann Mukus demnach nicht mehr transportiert werden, weil die Zilien ihn nicht mehr erreichen. Bei zu wenig Flüssigkeit bricht der Transport ebenfalls zusammen, da die zähe Muzinschicht die Bewegung der Zilien verhindert (Widdicombe und Widdicombe, 1995). Clunes und Boucher (2011) verweisen darauf, dass auch der Mukus imstande ist, über Flüssigkeitsaufnahme bzw. -abgabe die Menge der periziliären Flüssigkeit zu beeinflussen. Der Notwendigkeit einer genau definierten Schichtdicke widersprechen ebenfalls Kerem et al. (1999), die Patienten mit systemischen Pseudohypoaldosteronismus und dadurch bedingtem Ausfall der Natriumresorption im Atemwegsepithel untersuchten. Bei diesen Patienten konnten sie trotz der durch die osmotische Wirkung des Natriums größeren Menge periziliärer Flüssigkeit eine bei Erwachsenen erhöhte mukoziliäre Clearance messen. Weitere Erkenntnisse der Literatur sprechen ebenfalls gegen die Theorie, dass die Menge der periziliären Flüssigkeit exakt reguliert sein muss. So beschreiben Tarran et al. (2001b) sowie Randell und Boucher (2006), dass die Dicke der periziliären Flüssigkeitsschicht über den verschiedenen Zellarten im Trachealepithel unterschiedlich ist: Die Höhe beträgt über zilientragenden Zellen etwa 7  $\mu\text{m}$ , über nicht-zilientragenden Zellen etwa 3  $\mu\text{m}$ . Somit besitzt die periziliäre Flüssigkeit keine durchgängig einheitliche Dicke, was auch gegen deren exakte Regulation spricht. Desweiteren konnte bei Patienten mit cystischer Fibrose, bei der die Dicke der periziliären Flüssigkeitsschicht verringert ist (Tarran et al., 2001b) und Patienten mit chronisch obstruktiver Lungenerkrankung durch Inhalation mit hypertoner Salzlösung ein schnellerer Partikeltransport assoziiert mit einer Verbesserung der pulmonalen Situation erreicht werden (Donaldson et al., 2006; Elkins et al., 2006).

In murinen Bronchien (Borthwick et al., 1999) existiert physiologisch kein Mukus. Trotzdem funktioniert dort der zilienvermittelte Transport. Auch Klein et al. (2009) konnten bereits an

murinen ex-vivo Tracheen den zilienvermittelten Transport von 4,5 µm-großen Polystyrenpartikeln (Dynabeads) nach Entfernung des dort regulär vorhandenen Mukus nachweisen. Allerdings ist aktuell noch völlig unklar, ob auch Bakterien und Viren transportiert werden und wenn ja, auf welche Art und Weise. Die Notwendigkeit der genauen Regulation der periziliären Flüssigkeit sowie die Rolle des Mukus für den Transport sind bisher ebenfalls nur für Dynabeads geklärt (Klein et al., 2009). Sie bedürfen weiterer Untersuchungen mit Bakterien und kleinen Partikeln.

## 1.2 Immunabwehr in der Trachea

Neben der bereits beschriebenen mukoziliären Clearance (s. Kap. 1.1.4) gibt es in der Trachea noch eine Reihe weiterer organspezifischer Schutzmaßnahmen. Die Kombination aller Mechanismen kann in den meisten Fällen bereits das primäre Eindringen von Fremdstoffen verhindern bzw. erfolgreich abwehren.

### 1.2.1 Barrierefunktion

Die Barrierefunktion der Trachea zeichnet sich dadurch aus, dass sie unabhängig von einem Stimulus aktiv ist. Zu diesen Funktionen gehört die mukoziliäre Clearance, die einerseits den mechanischen Abtransport fremder Partikel gewährleistet (s. Kap. 1.1.4). Andererseits findet durch antimikrobielle Peptide, die im Mukus enthalten sind, bereits eine unspezifische Inaktivierung und Abtötung von Pathogenen statt. Die Sezernierung der Peptide kann zusätzlich durch Stimuli gesteigert werden. Zu diesen antimikrobiellen Peptiden gehören beispielsweise Lysozym, Laktoferrin,  $\beta$ -Defensine und Calprotectin, die über verschiedene Mechanismen das Wachstum von Mikroorganismen inhibieren bzw. diese abtöten (Ellison und Giehl, 1991; Bals und Hiemstra, 2004). Bezüglich der Effektivität der antimikrobiellen Peptide scheint der Hydratationszustand des Mukus eine wichtige Rolle zu spielen. So beschreiben Randell und Boucher (2006), dass bei reduzierter Hydratation des Mukus dessen Porengröße zu klein ist und daher die antimikrobiellen Stoffe nicht ihre volle Wirksamkeit entfalten können.

Außerdem verfügt das Trachealepithel durch Zell-Zell-Kontakte über eine weitere mechanische Barriere. Desweiteren befinden sich im Mukus Immunglobuline (IgA), die von Plasmazellen direkt unter dem Epithel (Lamina propria) sezerniert werden (Murphy et al., 2008b). Nach ihrer Produktion werden sie durch das Epithel transportiert, ein Teil von ihnen sezerniert und so an Mukus gebunden, dass ihre Antigenbindungsstellen in Richtung Lumen zeigen. Diese sezernierten Immunglobuline können nun durch Abfangen von Bakterien oder Toxinen deren Anhaften an den Epithelzellen verhindern. Da sie an Mukus gebunden sind, stellen sie so die Verbindung zwischen Antikörper und mukoziliärer Clearance dar. Somit ist auch der Abtransport der gebundenen Bakterien und Fremdstoffe gewährleistet (Murphy et al., 2008b).

### 1.2.2 Inflammatorische Reaktionen in den Epithelzellen nach Pathogenerkennung

Neben der zuvor beschriebenen Barrierefunktion existieren Abwehrmechanismen auf zellulärer Ebene, die bei Bedarf aktiviert werden können. Diese Aufgabe wird von denjenigen Zellen übernommen, die den ersten Kontakt zu den Bakterien haben, den Epithelzellen. Damit Epithelzellen bemerken, dass Bakterien eingedrungen sind, müssen sie über spezielle „Sensoren“ auf ihrer Oberfläche verfügen, die bestimmte Merkmale von Bakterien und anderen Pathogenen erkennen. Diese Sensoren sind Rezeptoren, genauer gesagt *pattern recognition receptors* (PRR).

Durch PRR auf den Epithelzellen werden bestimmte *pathogen associated molecular patterns* (PAMP) auf der Oberfläche von Bakterien, Pathogenen und anderen Stoffen erkannt. Dadurch wird dort intrazellulär eine Signalkaskade initiiert, die zur Aktivierung bestimmter Gene führt. In Abhängigkeit davon, welche PAMPs identifiziert werden, erfolgt die Aktivierung unterschiedlicher Gene. Zu dieser Gruppe der PRR gehören die für das Erkennen von Bakterien sehr wichtigen Toll-like-Rezeptoren (TLR). Bisher sind 13 TLR bei Säugern bekannt (Akira et al., 2006; Shi et al., 2011). TLR verfügen über einen grundsätzlich gleichen Aufbau. Sie sind integrale Membranglykoproteine, die eine extrazelluläre Domäne, Leucinreiche Wiederholungen (LRR) und eine cytoplasmatische Domäne, die Toll-IL1-Rezeptor-Domäne (TIR), besitzen (O'Neill und Bowie, 2007). TLR1, 2, 4, 5 und 6 befinden sich auf der Zelloberfläche, TLR3, 7 und 9 hingegen in der endosomalen Membran. Mit Ausnahme des TLR2 bilden sich immer Homodimere der Rezeptoren aus. TLR2 dimerisiert entweder mit TLR1 oder TLR6 und erkennt je nachdem geringfügig differierende Liganden (Diacylllipopeptide bzw. Triacyllipopeptide). In der vorliegenden Arbeit spielen TLR2 und TLR4 eine wichtige Rolle. TLR2 detektiert Lipoteichonsäure (LTA) und Lipoproteine gram-positiver Bakterien. TLR4 identifiziert Lipopolysaccharid (LPS) gram-negativer Bakterien (Wieland et al., 2005; Murphy et al., 2008c; Balamayooran et al., 2010).

Zur Erkennung des LPS durch TLR4 muss LPS zunächst von dem LPS-bindenden Protein LBP<sup>2,3</sup> gebunden werden (Peri et al., 2010, vgl. Abb. 1.5a, nächste Seite). Anschließend muss die Bindung an das Oberflächenprotein CD14<sup>4</sup> (Haziot et al., 1996) und MD-2<sup>5</sup> (Nagai et al., 2002) erfolgen. Danach kann die Interaktion zwischen gebundenem LPS und TLR4 beginnen (Murphy et al., 2008c). Nach Ligandenbindung kommt es zum Andocken von Adaptermolekülen an die cytoplasmatische TIR-Domäne des TLR4. Eines dieser Adapterproteine ist MyD88<sup>6</sup>, welches wichtig für die TLR4-vermittelte Signalkaskade ist (Balamayooran et al., 2010). Es bildet den sog. MyD88-abhängigen Weg. Nach einigen Zwischenschritten

---

<sup>2</sup>Aufgrund der Länge der Fachbegriffe empfiehlt es sich der besseren Lesbarkeit halber im Text nur mit den Kurzformen zu arbeiten und in der Fußnote die eigentliche Bezeichnung zu nennen.

<sup>3</sup>LBP = LPS-bindendes Protein

<sup>4</sup>CD14 = cluster of differentiation 14

<sup>5</sup>MD-2 = Lymphozytenantigen 96

<sup>6</sup>MyD88 = myeloider Differenzierungsfaktor 88

(s. Abb. 1.5a) wird das intrazelluläre  $I\kappa B^7$  phosphoryliert und somit dessen Ubiquitinierung und Degradation induziert (Murphy et al., 2008c). Infolgedessen kann  $NF\kappa B^8$  frei in den Zellkern translozieren.  $NF\kappa B$  als Transkriptionsfaktor kann dann durch Binden an regulatorische Abschnitte der Desoxyribonukleinsäure (DNA) die Transkription bestimmter Gene induzieren oder verhindern (Covert et al., 2005; Murphy et al., 2008c).

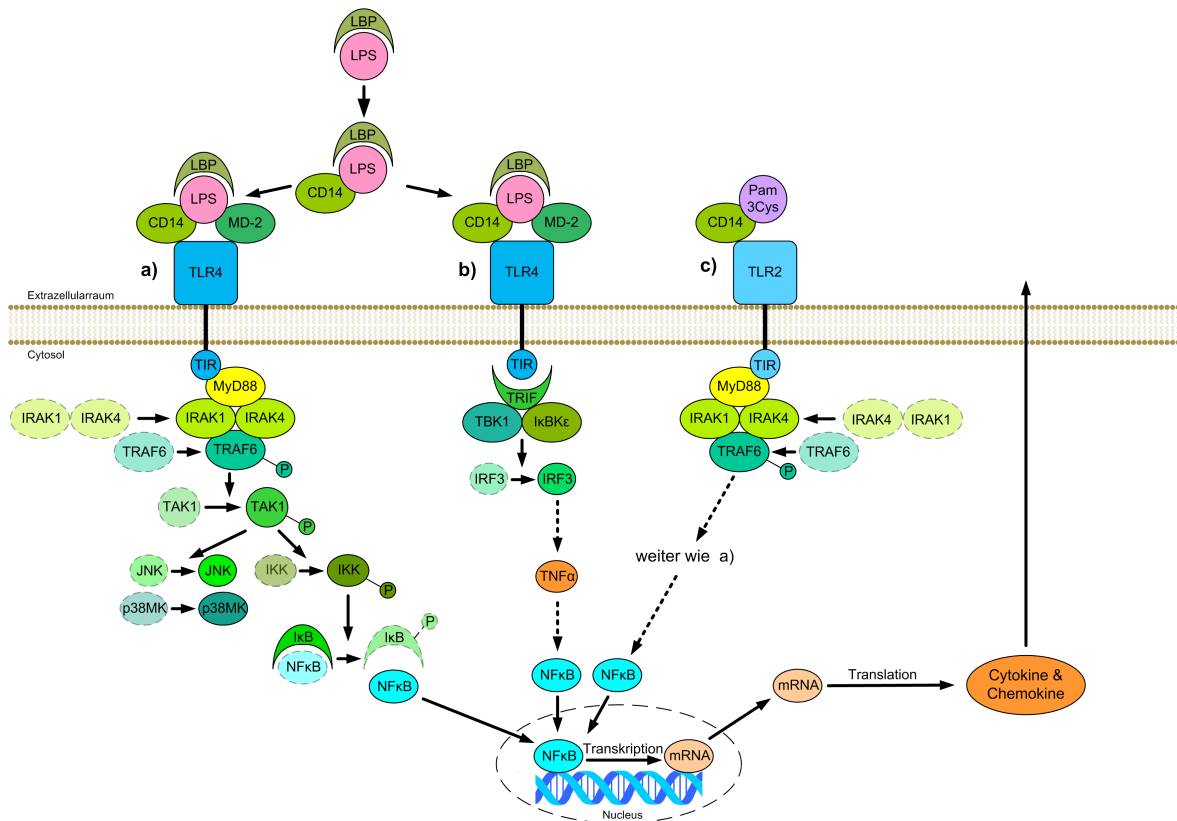


Abbildung 1.5: TLR4- und TLR2-vermittelte Immunkaskade mit konsekutiver Produktion proinflammatorischer Mediatoren. Dargestellt sind der MyD88-abhängige Weg, der sowohl TLR4- (a) als auch TLR2-vermittelt (c) induziert wird, und der zeitlich verzögert einsetzende MyD88-unabhängige Weg (b), der nur TLR4-vermittelt abläuft. Einzelheiten s. Kap. 1.2.2.

Neben diesem Weg gibt es noch eine weitere Möglichkeit zur Translokation von  $NF\kappa B$ : den MyD88-unabhängigen Weg (s. Abb. 1.5b), der zeitlich verzögert einsetzt (Kawai et al., 1999; Kawai et al., 2001; Covert et al., 2005). Dieser Weg ist noch nicht vollständig entschlüsselt. Dabei wird über Zwischenschritte TRIF-vermittelt<sup>9</sup>  $TNF\alpha^{10}$  gebildet (McWhirter et al., 2004), das über den TNF-Weg die Translokation von  $NF\kappa B$  in den Zellkern mit konsekutiver Transkription und Translation von Cytokinen und Chemokinen induziert (Covert et al., 2005).

Die TLR2-induzierte Translokation von  $NF\kappa B$  läuft genauso ab wie der MyD88-abhängige Signalweg des TLR4-Rezeptors (s. Abb. 1.5c). Nach Ligandenbindung an CD14 (Manukyan

<sup>7</sup> $I\kappa B$  = Inhibitor des  $\kappa B$

<sup>8</sup> $NF\kappa B$  = nukleärer Faktor  $\kappa B$

<sup>9</sup>TRIF = TIR-Domäne-enthaltender Adapter-induzierendes Interferon- $\beta$

<sup>10</sup> $TNF\alpha$  = Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$

et al., 2005) und TLR2 erfolgt die Initiierung der Signalkaskade. Sie durchläuft die gleichen Schritte wie die TLR4-vermittelte Aktivierung mit Translokation von  $\text{NF}\kappa\text{B}$  in den Zellkern und mündet damit auch in der Bildung proinflammatorischer Cytokine und Chemokine (Balamayooran et al., 2010).

Wenn ein Pathogen an einem der PRR erkannt wurde, wird durch die Translokation des  $\text{NF}\kappa\text{B}$  und die anschließende Transkription entsprechender Genabschnitte *messenger* Ribonukleinsäure (mRNA) gebildet. Diese kann dann der Translation zugeführt werden und bringt die entsprechenden Proteine hervor. Im Falle eines Pathogens wären das vor allem proinflammatorische Cytokine und Chemokine. Um eine überschießende Immunantwort zu verhindern, gibt es aber ebenso Cytokine, die antiinflammatorische Funktionen besitzen.

### 1.2.3 Nachweis der initialen Entzündungsreaktion in Epithelzellen

Nach Aktivierung von TLR4 bzw. TLR2 werden über den beschriebenen Mechanismus (s. Kap. 1.2.2)  $\text{NF}\kappa\text{B}$ -abhängig proinflammatorische Cytokine und Chemokine gebildet. Um Aussagen über die Effektivität der  $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Aktivierung anhand der initialen Entzündungsreaktion treffen zu können, ist es wichtig zu wissen, ob eine allgemeine Aktivierung des adaptiven Immunsystems sowie eine Rekrutierung neutrophiler Granulozyten eintritt. Der Nachweis bestimmter Cytokine und Chemokine bzw. ihrer mRNA ermöglicht dies. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Untersuchung der mRNA – stellvertretend für die eigentlichen Cytokine und Chemokine – aufgrund ihrer höheren Sensitivität und ihres schnelleren Nachweises (Huggett et al., 2005).

Um Aussagen über eine allgemeine Aktivierung des adaptiven Immunsystems treffen zu können, bieten sich Interleukin 6 (IL6) und das Monozyten-chemotaktische Protein 1 (MCP-1) an (Murphy et al., 2008a). In gleicher Weise sind CXCL5, das aus Keratinozyten abgeleitete Chemokin (KC) und das Makrophagen-inflammatorische Protein 2 (MIP-2) geeignet, um die Rekrutierungsstärke neutrophiler Granulozyten zu evaluieren (Balamayooran et al., 2010). Im Folgenden werden diese Cytokine und Chemokine kurz erläutert.

IL6 ist ein Cytokin, welches das T- und B-Zellwachstum sowie deren Differenzierung fördert. Außerdem ist es als Akute-Phase-Protein an der hypothalamischen Temperaturregulation beim Fieber beteiligt (Murphy et al., 2008a). Bei MCP-1 handelt es sich um ein Chemokin, das Lymphozyten anlockt und somit die Verbindung zum erworbenen Immunsystem darstellt (Murphy et al., 2008a). Über die Aktivierung des erworbenen Immunsystems wird einerseits die aktuelle Infektion verzögert bekämpft. Andererseits tritt im Falle eines erneuten Kontakts mit dem Pathogen die Immunantwort viel schneller ein (Prinzip einer Impfung).

Im Gegensatz dazu ist das CXCL5 ein inflammatorisches Chemokin, das neutrophile Granulozyten anlockt und als Antwort auf  $\text{IL1}\beta$  oder  $\text{TNF}\alpha$  freigesetzt wird (Chang et al., 1994; Balamayooran et al., 2010). Somit sorgt es für die Aktivierung der angeborenen Immunabwehr (Murphy et al., 2008a). Beispielsweise im Rahmen akuter Exazerbationen der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung wird CXCL5 vermehrt freigesetzt (Papi et al., 2006).

Ebenfalls zur Gruppe der Chemokine, die neutrophile Granulozyten anlocken, gehört KC (Murphy et al., 2008a; Balamayooran et al., 2010). Es lässt sich z. B. nach Exposition gegenüber Zigarettenrauch im Bronchoalveolarraum und im Lungenparenchym von Mäusen nachweisen (Demoor et al., 2011). MIP-2 ist ein weiteres Chemokin, das neutrophile Granulozyten anlockt (Murphy et al., 2008a; Balamayooran et al., 2010). Sie können Pathogene dann direkt phagozytieren, mittels sezernierter Stoffe abtöten und über die Bildung neutrophiler extrazellulärer Netze die Ausbreitung von Bakterien hemmen (Brinkmann et al., 2004; Hemmers et al., 2011).

#### **1.2.4 Immunreaktion in der murinen ex-vivo Trachea**

Grundsätzlich ist also bekannt, wie inflammatorische Reaktionen in den Atemwegen ablaufen. Allerdings stammen die Beobachtungen und Erkenntnisse oftmals aus Versuchen, bei denen man mit Epithelzellen in der Zellkultur gearbeitet hat. Diese Zellkulturen sind leicht durchzuführen und reproduzierbar. Ihnen fehlt aber, im Gegensatz zu in-vivo Versuchen, die Interaktion zwischen Epithel, umgebenden stationären sowie beweglichen Zellen. Außerdem beinhalten Zellkulturen oftmals nur eine einzige Zellart und nicht die physiologische Zellvielfalt, wie sie beispielsweise in der Trachea gegeben ist. Diese fehlende Vielfalt und Interaktion verhindern es, genaue Aussagen über in-vivo Abläufe treffen zu können. Da in-vivo Untersuchungen in dieser Art nicht möglich sind, benötigt man ein Modell, das der in-vivo Situation nahe kommt. Dafür bietet sich das ex-vivo Modell an, das einen Kompromiss zwischen in-vitro und in-vivo darstellt.

Um Ergebnisse zu erhalten, die zwar im Tierversuch gewonnen, aber idealerweise auf den Menschen übertragbar sind, empfehlen sich murine Tracheen, da sie von ihrem Aufbau her humanen Bronchien ähneln (Pack et al., 1980; Kretschmer, 2012). Beide besitzen mehrreihiges respiratorisches Epithel mit Basalzellen, subepitheliale Drüsen und ein Knorpelgerüst.

### **1.3 Entstehung von Infektionen**

Trotz Einatmen von Pathogenen führt dies nicht immer automatisch zu (wahrnehmbaren) pulmonalen Infekten. Dennoch muss es bestimmte Bedingungen geben, die zu einem solchen Infekt führen. Ob die Inkubation mit Bakterien und -wandbestandteilen ausreicht, um eine Entzündung in gesunden Epithelzellen der murinen ex-vivo Trachea zu induzieren, ist unklar. Ebenso gibt es keine Untersuchungen, in welcher Zellart bzw. welchen Zellarten die inflammatorischen Reaktionen entstehen. Naheliegend und daher von Proud und Leigh (2011) angenommen sind sicherlich zilienträgende Zellen, die primär Kontakt zu den Pathogenen haben. In welchem Zeitfenster Reaktionen erwartet werden können und wann sie maximal sind, ist ebenfalls unklar.

In der kalten Jahreszeit kommt es zu einer erhöhten Rate pulmonaler Infekte (Fielder, 1989; Danielides et al., 2002; Hajat et al., 2004). Nach vorherrschender Theorie nimmt man an, dass kalte, trockene Luft das empfindliche Atemwegsepithel verletzt (Chimenti et al., 2007; Sue-Chu, 2012) und es darüber meistens zum Eintritt von primär Viren und sekundär Bakterien mit anschließender Infektion kommt (Sajjan et al., 2008; Spaniol et al., 2009; Mäkinen et al., 2009). Ob diese Theorie als alleinige Erklärung ausreicht oder ob vielmehr die reduzierte Zilienschlagfrequenz in Kombination mit einer veränderten inflammatorischen Reaktion in den Epithelzellen die entscheidende Rolle spielt, ist ebenfalls noch ungeklärt.

## 1.4 Fragestellung

Die Interaktion zwischen gesundem Atemwegsepithel und Bakterien kann zu komplexen Abwehrvorgängen bzw. einer Infektion führen. Bezüglich der mukoziliären Clearance, die als wichtiger Abwehrmechanismus fungiert, existieren konkurrierende Theorien (s. Kap. 1.1.4). Die Unterschiede liegen dabei in der Frage nach der Notwendigkeit von Mukus und genauer Regulation der Menge periziliärer Flüssigkeit. Daraus ergab sich erstens die Frage: STIMMT DIE BISHERIGE THEORIE DES MUKOZILIÄREN TRANSPORTS IN DEN ATEMWEGEN UND WELCHE PARTIKEL WERDEN ÜBERHAUPT TRANSPORTIERT?

Trotz guter mukoziliärer Clearance kommen Pathogene in Kontakt mit dem Atemwegsepithel (s. Kap. 1). Dies führte zu der zweiten Frage: FÜHRT DER KONTAKT VON BAKTERIEN MIT EPITHEL IM EX-VIVO MODELL ZUR SIGNALTRANSDUKTION IN DEN EPITHELZELLEN? WELCHEN ZELLTYP BETRIFFT DAS?

Die mukoziliäre Clearance als einer der Hauptabwehrmechanismen in der Trachea wird in ihrer Wirksamkeit von verschiedenen Faktoren beeinflusst. Sie ist beispielsweise über die Zilienschlagfrequenz von der Temperatur insofern abhängig, als sie bei Temperaturreduktion abnimmt (s. Kap. 1.1.3). Durch diese Abnahme steigt die Kontaktzeit zwischen Epithel und Bakterien bzw. die Verweildauer der Pathogene in den Atemwegen. Daraus ergab sich als dritte Frage: WELCHEN EINFLUSS HAT TEMPERATUR AUF DIE ABWEHRFUNKTION? IST DADURCH KOMPENSATORISCH DIE INTRAZELLULÄRE IMMUNANTWORT HOCHREGULIERT ODER WIRD SIE IM SINNE EINER DEPRESSION DER GESAMTZELLE HERUNTERGEFAHREN?

## **2 Material und Methoden**

Zur genaueren Untersuchung zilienvermittelten Transports in den Atemwegen der Maus wurde das ex-vivo Modell gewählt und darin der Transport von Partikeln und Bakterien sowie deren Anheftungseigenschaften untersucht. Außerdem waren Interaktionen zwischen gesundem Atemwegsepithel, Bakterien und ihren Zellwandbestandteilen Gegenstand der Untersuchungen, um Aufschlüsse über die Signaltransduktion zu erhalten. Im Zuge dieser Untersuchungen konnte eine neue Technik zur Gewinnung von Trachealepithelzellen entwickelt werden.

### **2.1 Tiertötungsgenehmigung**

Das Ministerium für Umwelt, Naturschutz und Landwirtschaft des Landes Schleswig-Holstein genehmigte die Tötung der Mäuse mit anschließender Organentnahme zu wissenschaftlichen Zwecken (Tiertötungsnummer V 312-72241.122-1).

### **2.2 Versuchstiere**

Für die Versuche wurden männliche Mäuse des Stammes C57BL/6NCrl (Charles River Laboratories, Sulzfeld) und C57BL/6JRj (Janvier, Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) im Alter von 6 bis 30 Wochen verwandt. Die Tiere wurden in der offenen Tierhaltung der Universität zu Lübeck bzw. ab dem 07.10.2009 in der experimentellen Tierhaltung der zentralen Tierhaltung der Universität zu Lübeck gehalten. Die Tiere erhielten Wasser und Futter ad libitum. In klimatisierten Räumen wurde ein je 12 h dauernder Tages- und Nachtrhythmus gewährleistet.

### **2.3 Präparation der Trachea**

Die Mäuse wurden durch Einatmen einer Überdosis Isofluran (Isofluran Baxter, Unterschleißheim) getötet, die subrenale Aorta durchtrennt, der Thorax eröffnet und die Trachea herauspräpariert. Die umliegenden Strukturen wie Thymus, Herz und Muskulatur wurden unter mikroskopischer Kontrolle entfernt bzw. zur Seite geschoben (s. Abb. 2.1a, nächste Seite).

Danach wurde die Trachea distal an den zwei Hauptbronchien sowie unterhalb des Larynx mittels einer Mikroschere (FST, Heidelberg) abgetrennt. Nach Säuberung und Entfernung noch anhängender Gewebereste wurde die jeweilige Trachea mit Minutien (s. Abb. 2.1b) in einer beheizbaren Kulturschale (Delta T Culture Dish, Bioprotechs Inc., Butler, USA) mit Sylgardboden (Sylgard Polymer 184 Curing Agent Silicone Elastomer, Dow Corning GmbH, Wiesbaden) so festgesteckt, dass der Musculus trachealis nach oben zeigte. Um einerseits das Austrocknen zu verhindern und andererseits die Ernährung zu gewährleisten, enthielt die Kulturschale 2 ml Hepes-gepufferte Ringerlösung (KCl 5,6 mM (Merck KGaA, Darmstadt), NaCl 136,4 mM (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe), MgCl<sub>2</sub> 1 mM (Merck KGaA), CaCl<sub>2</sub> 2,2 mM, (Merck KGaA) Glucose 11 mM (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München), HEPES 10 mM (Carl Roth GmbH & Co. KG), pH 7,4). Daraufhin wurde der Musculus trachealis der Länge nach durchtrennt, ohne das gegenüberliegende Epithel mit der Schere zu berühren (s. Abb. 2.1b). Nach Verwerfen des Mediums wurde der noch auf der Trachea vorhandene Mukus durch mehrmaliges Spülen mit 1 ml Hepes-gepuffertes Ringerlösung von der Trachea entfernt. Anschließend wurden erneut 2 ml Hepes-gepufferte Ringerlösung hinzugefügt.

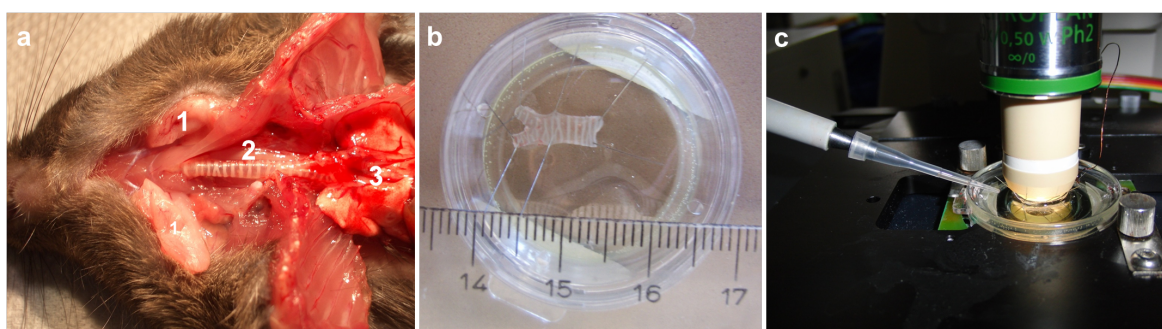


Abbildung 2.1: Blick auf (a) eröffneten Thorax der Maus: Nr. 1 stellt die Glandula submandibularis, Nr. 2 die Trachea und Nr. 3 die Lunge dar. (b) Festgesteckte Trachea in der Kulturschale. Bild (c) zeigt den Versuchsaufbau am Hochgeschwindigkeitsmikroskop.

## 2.4 Messung des zilienvermittelten Transports

Um Aufschluss über den zilienvermittelten Transport in der murinen Trachea zu erhalten, wurde Mukus entfernt und die periziliäre Flüssigkeit durch ein Übermaß an Hepes-gepuffertes Ringerlösung ersetzt. Anschließend wurden synthetische Partikel und Bakterien hinzugegeben. Diese Maßnahmen ermöglichten die Untersuchung des rein zilienvermittelten Transports.

### 2.4.1 Ermittlung der Transportgeschwindigkeit

Zur Ermittlung der zilienvermittelten Transportgeschwindigkeit von Partikeln und Bakterien kam das Mikroskop Axioskop 2 FS plus (Carl Zeiss, Göttingen) zum Einsatz. Für Durchlichtaufnahmen wurden die Kamera SMX-150M (2/3" monochrome 1,3 Megapixel CMOS-Kamera, EHD Imaging GmbH, Damme; folgend: SMX-Kamera) und für Epifluoreszenzaufnahmen eine SPOT RT Slider (Model 2.3.1, CCD-Kamera, Diagnostic Instruments, Inc., Sterling Heights, USA; folgend: SPOT-Kamera) genutzt und Filme aufgenommen. Die Beleuchtung für Durchlichtaufnahmen war im Mikroskop integriert, bei Fluoreszenzaufnahmen kam sie aus einer Kompaktlichtquelle (HXP 120, Leistungselektronik Jena GmbH). Die konstante Temperierung von 30 °C wurde über den Biopetechs Delta T4 Culture Dish Controller (Delta T4 Culture Dish Controller, Biopetechs Inc., Butler, USA) gewährleistet.

Die Filme wurden mit einem Eintauchobjektiv mit 40-facher Vergrößerung (ACHROPLAN 40x/0,80 w  $\infty$ /0, Zeiss) aufgenommen. Bei Einsatz der SPOT-Kamera wurde mit 6 Hz und einer Auflösung von 1600·1200 aufgenommen (90 Bilder/Film). Die SMX-Kamera nutzte die Aufnahmefrequenzen 12 Hz mit der Auflösung 1280·1024 (176 Bilder/Film), 100 Hz mit der Auflösung 640·480 (990 Bilder/Film) und 471 Hz mit der Auflösung 256·128 Pixel (942 Bilder/Film). Mithilfe des Programms StreamPix 3.31.0 (NorPix, Inc., Montreal, Kanada) wurden die Filme aufgezeichnet. Durch Zugabe synthetischer Partikel (Details s. 2.4.2 und 2.4.3) und Bakterien (Details s. 2.4.4) konnte die Transportgeschwindigkeit ermittelt werden.

Um die Geschwindigkeit zweier Partikelsorten zu vergleichen, wurden Filme gewählt, in denen die zu vergleichenden Partikel bzw. Partikel und Bakterien beide vorkamen. So konnte der Einfluss etwaiger besonders schneller oder auch besonders langsamer Tracheaareale eliminiert werden. Um die Funktion der Trachea bzw. der zilientragenden Zellen einschätzen zu können, wurden am Ende des Versuchs 20  $\mu$ l 10 mM ATP (A9062-1g, Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Endkonzentration 100  $\mu$ M) hinzugegeben. Da darüber eine Steigerung der Zilienschlagfrequenz erreicht werden kann, sollte somit auch die Transportgeschwindigkeit zunehmen. Kam es trotz ATP-Zugabe nicht zu einer Erhöhung der Transportgeschwindigkeit, war dies ein Indiz für eine Störung des zilienvermittelten Transports und damit ein Abschlussgrund der betroffenen Trachea.

Mithilfe von Image Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, Inc., Bethesda, USA) konnten Geschwindigkeiten ermittelt werden. Dazu wurden zunächst alle Einzelbilder eines Films miteinander verglichen und der gleichbleibende Teil der Bilder abgezogen (s. Abb. 2.2a und b), in der Annahme, dass es sich um den Hintergrund handelte. Danach wurden Partikel bzw. Bakterien detektiert (s. Abb. 2.2c). In jedem Einzelfilm wurde manuell die Grauschwelle zwischen 1 und 255 eingestellt. Zwischen dieser und 255 (Dynabeads) bzw. unter dieser und 1 (Bakterien und Fluoresbrite) wurden dann die Positionsveränderungen von einem Bild zum anderen berechnet. Aus den Veränderungen der einzelnen Bilder ermittelte das Programm *Tracks* (Spuren, s. Abb. 2.2d), die allerdings noch kontrolliert werden mussten (s.u.).

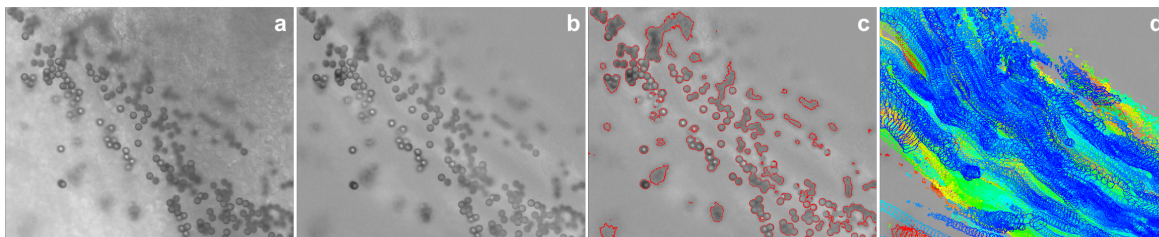


Abbildung 2.2: Ermittlung der Transportgeschwindigkeit von Partikeln. Bild (a) zeigt ein Bild aus dem Originalvideo. Auf Bild (b) ist der konstante Teil subtrahiert worden. Bild (c) zeigt die erkannten Partikel (rot umrandet) und Bild (d) deren Ortsveränderungen, woraus *Tracks* berechnet werden können.

Um aus den *Tracks* Geschwindigkeiten zu erhalten, maß die Software für jeden Partikel die zurückgelegte Entfernung von einem Bild zum nächsten. Danach berechnete sie aus der Zeit und der gemessenen Entfernung die Einzelgeschwindigkeit, mit der ein Partikel zwischen den beiden Bildern transportiert wurde. Diese Einzelgeschwindigkeiten konnten direkt zur Untersuchung der Diskontinuität der Transportgeschwindigkeit von Partikeln verwendet werden (s. Kap. 2.4.6). Außerdem berechnete das Programm aus den Einzelwerten eine Durchschnittsgeschwindigkeit des Partikels, woraus wiederum Durchschnittswerte eines Areals bzw. der ganzen Trachea berechnet werden konnten. Sie wurden für alle anderen Geschwindigkeitsbestimmungen verwendet. Da diese Geschwindigkeiten noch nicht an Größe und Aufnahmefrequenz angepasst waren, mussten diese relativen Geschwindigkeiten noch korrigiert werden. Die Umrechnung der relativen in absolute Werte erfolgte mithilfe eines Maßstabs (STAGE Micrometer Diamond Ruled, 1mm Divided 0,1 & 0,01 mm, Martock Design Ltd. Martock, Somerset, England), über den die Größe eines Pixels ermittelt werden konnte. Außerdem wurde mit einem zeitlichen Korrekturfaktor gearbeitet, mit dem die unterschiedlichen Aufnahmefrequenzen und damit die Einzelbilddauer berichtigt werden konnten.

Da die gewünschte hohe Sensitivität der Partikelerkennung zu Lasten der Spezifität ging, wurden oftmals andere Strukturen als die gewünschten Partikel oder Bakterien als *Track* erkannt. Alternativ wurde häufig die richtige Spur eines Partikels nach wenigen Bildern mit einem zweiten *Track* vermischt. Um fehlerhafte *Tracks* aufzuspüren, wurde daher jeder einzelne Film auf diese zwei Fehlermöglichkeiten hin untersucht. Nach der Kontrolle der *Tracks* konnte mit den korrekten Werten weitergearbeitet werden.

### 2.4.2 Transportgeschwindigkeit von Polystyrenpartikeln

Zur allgemeinen Untersuchung des zilienvermittelten Partikeltransports dienten Dynabeads (CELLlection™ Biotin-Binder Kit,  $4 \cdot 10^8$  beads/ml; Dynal Biotech ASA, Oslo, Norwegen), Polystyrenpartikel mit einem Durchmesser von  $4,5 \mu\text{m}$ . Zur Verwendung dieser Partikel mussten sie zunächst aufbereitet werden. Nach Entnahme von  $200 \mu\text{l}$  aus dem Kit wurden diese zentrifugiert ( $\sim 6.000 \text{ rpm}$ ) und der Überstand verworfen. Im Anschluss daran wurden  $250 \mu\text{l}$  Hepes-gepufferte Ringerlösung hinzugefügt, erneut zentrifugiert und der Überstand verwor-

fen. Diese Abfolge wurde insgesamt viermal durchgeführt. Danach wurden 150 µl HEPES-gepufferte Ringerlösung hinzugegeben und die aufbereiteten Dynabeads in kleinere Gefäße aliquotiert.

Nach Zugabe von etwa  $3,20 \cdot 10^6$  Dynabeads erfolgte die Observation und Dokumentation des Transports. Dazu wurden das Eintauchobjektiv mit 40-facher Vergrößerung und die SMX-Kamera genutzt. Für Übersichtsaufnahmen wurde sowohl mit der Bildwiederholffrequenz von 12 Hz und der Auflösung 1280·1024 Pixel als auch mit 100 Hz und der Auflösung 640·480 Pixel aufgenommen.

### 2.4.3 Transportgeschwindigkeit von Fluoresbrite-Partikeln

Um Aufschluss über den Transport von Partikel zu erhalten, die der Größe eines Virus entsprechen, wurde mit Fluoresbrite (Fluoresbrite YG Microspheres 0,20 µm:  $5,9 \cdot 10^{12}$  Partikel/ml; Polysciences Inc, Eppelheim) gearbeitet. Dazu wurden etwa  $5,68 \cdot 10^7$  Fluoresbrite in den oben beschriebenen Versuchsaufbau eingesetzt. Zum Vergleich der Transporteigenschaften wurden parallel etwa  $3,20 \cdot 10^6$  Dynabeads eingesetzt. Da die Fluoresbrite-Partikel fluoreszierten, war es möglich, sie von den Dynabeads zu unterscheiden. Mithilfe von Durchlicht und Fluoreszenz konnte der Transport von Fluoresbrite mit dem der Dynabeads verglichen werden. Daher kamen zur Beobachtung und Dokumentation die SMX-Kamera und das Eintauchobjektiv mit 40-facher Vergrößerung zum Einsatz. Die Dokumentation geschah mit der Bildwiederholffrequenz von 6 Hz und der Auflösung 1600·1200 Pixel.

### 2.4.4 Transportgeschwindigkeit von Bakterien

Zur Untersuchung des bakteriellen Transports kamen Bakterien der Stämme *Escherichia coli* 35218 (*E. coli*) und *Staphylokokkus epidermidis* 12228 (*S. epidermidis*) (beide ATCC, LGC Standards GmbH, Wesel) zum Einsatz. Einen Tag vor Einsatz der Bakterien im Versuch wurden sie auf Agarplatten mittels einer Ausstreichöse verteilt und 24 h im Inkubator bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> bebrütet. Am nächsten Tag wurde jeweils eine McFarland 4-Bakteriensuspension (enthielt  $3,93 \cdot 10^9$  Bakterien *E. coli* bzw.  $1,70 \cdot 10^9$  Bakterien *S. epidermidis*) aus *E. coli* und *S. epidermidis* in HEPES-gepufferten Ringerlösung hergestellt.

Um in den Videos Bakterien sicher detektieren und damit deren Transportgeschwindigkeit ermitteln zu können, wurden die Bakterien mit SYTO 16 (SYTO 16 green fluorescent: nucleic acid stain, 1 mM solution in DMSO; Invitrogen, Darmstadt) angefärbt. Dazu wurden 100 µl der jeweiligen Bakteriensuspension mit 1 ml HEPES-gepufferten Ringerlösung versetzt und anschließend für 5 min bei 10.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml HEPES-gepufferten Ringerlösung resuspendiert. Danach wurden 1,5 µl SYTO 16 hinzugefügt, vermischt und bei Raumtemperatur in der Dunkelheit für 15 min inkubiert. Daraufhin erfolgte die Zugabe von 100 µl dieser Suspension zu den 2 ml HEPES-gepufferten Ringerlösung (Endkonzentration *E. coli*  $3,93 \cdot 10^8$  bzw. *S. epidermidis*  $1,70 \cdot 10^8$  cfu/Trachea)

in der Kulturschale mit der Trachea (s. Abb. 2.1b). Zum Vergleich der Transporteigenschaften wurden parallel  $3,20 \cdot 10^6$  Dynabeads eingesetzt. Zur Beobachtung und Dokumentation kamen die SPOT-Kamera und das Eintauchobjektiv mit 40-facher Vergrößerung zum Einsatz. Es wurde sowohl mit der Bildwiederholfrequenz von 6 Hz als auch mit 8 Hz und den Auflösungen 1600·1200 bzw. 800·600 Pixel aufgenommen. Wie bei den Fluoreszenz fanden auch Durchlicht und Fluoreszenz Anwendung.

Um ein durch den DNA-Farbstoff verfälschtes Anheftungsverhalten seitens der Bakterien oder der Trachea auszuschließen, wurde auch mit ungefärbten Bakterien gearbeitet. Dazu wurden aus der McFarland 4-Bakteriensuspension 100  $\mu$ l zur aufgespannten Trachea, die sich in 2 ml Hepes-gepufferter Ringerlösung befand, gegeben und vermischt. Die 100  $\mu$ l aus der Bakteriensuspension entsprachen in den Versuchen  $3,93 \cdot 10^8$  (*E. coli*) bzw.  $1,70 \cdot 10^8$  (*S. epidermidis*) cfu/Trachea. Danach erfolgten die beschriebenen Transportuntersuchungen.

#### 2.4.5 Transportgeschwindigkeit in Abhängigkeit vom Abstand zum Epithel

Der Versuchsaufbau zur Ermittlung der Transportgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Entfernung zum Epithel entsprach dem der Geschwindigkeitsmessung. Nach Zugabe von etwa  $3,20 \cdot 10^6$  Dynabeads wurde das Videomikroskop auf ein Tracheaareal mit guten Transporteigenschaften gerichtet und die Ebene der zilientragenden Zellen scharf gestellt. Anschließend wurde die Fokusebene in 50  $\mu$ m-Schritten vom Epithel entfernt und der Partikeltransport per Video dokumentiert. Um verlässliche Ergebnisse zu erzielen, wurde jeder dieser Schritte innerhalb des gewählten Tracheaareals viermal aufgenommen. Daraus ergeben sich bei fünf Tracheen zwanzig Filme. Die Filme wurden mit dem Eintauchobjektiv mit 40-facher Vergrößerung, mit der Bildwiederholfrequenz von 12 Hz und der Auflösung von 1280·1024 Pixel aufgenommen. Da jenseits von 400  $\mu$ m Entfernung vom Epithel bzw. bereits vorher oftmals kein gerichteter Transport mehr feststellbar war, erfolgte die Beobachtung bis 400  $\mu$ m. Die Transportgeschwindigkeit auf verschiedenen Ebenen wurde sowohl ohne ATP-Zugabe als auch nach Zugabe von 20  $\mu$ l 10 mM ATP (Endkonzentration 100  $\mu$ M) ermittelt.

#### 2.4.6 Diskontinuität der Transportgeschwindigkeit

Um zu untersuchen, aus welchen Einzelgeschwindigkeiten sich die durchschnittliche Transportgeschwindigkeit eines Partikels zusammensetzt, wurde das gleiche Setup wie zur Geschwindigkeitsmessung verwendet. Die Untersuchung erfolgte auch hierbei in unterschiedlichem Abstand zum Epithel (0 bis 100  $\mu$ m), um die Breite der Variabilität dieser Einzelgeschwindigkeiten zu untersuchen. Nach Zugabe von etwa  $8 \cdot 10^6$  Dynabeads erfolgte die Observation und Dokumentation. Dazu wurde die SMX-Kamera mit den Bildwiederholfrequenzen von 100 Hz und einer Auflösung von 640·480 bzw. 471 Hz und einer Auflösung von 256·128 Pixel genutzt.

## 2.5 Ermittlung der Zilienschlagfrequenz in Abhängigkeit von der Temperatur

Das Messen der Zilienschlagfrequenz erfolgte nach Präparation der Trachea im gleichen Setup wie die Messung des Partikeltransports. Dazu wurde ein Tracheaareal mit intakten zilientragenden Zellen ausgewählt. In Zwei-Grad-Schritten wurde die Temperatur von 24,2 °C auf 44,2 °C erhöht. Die Filme wurden mit der SMX-Kamera, dem 40-fach vergrößernden Ein-tauchobjektiv und der Bildaufnahmefrequenz von 100 Hz bei einer Auflösung von 640·480 Pixel aufgenommen. In diesen Filmen wurden zehn zilientragende Zellen bestimmt, die in allen gewählten Filmen wiedergefunden werden konnten. Innerhalb dieser zehn Zellen gab es direkt benachbarte und nicht benachbarte Zellen (s. Abb. 2.3).

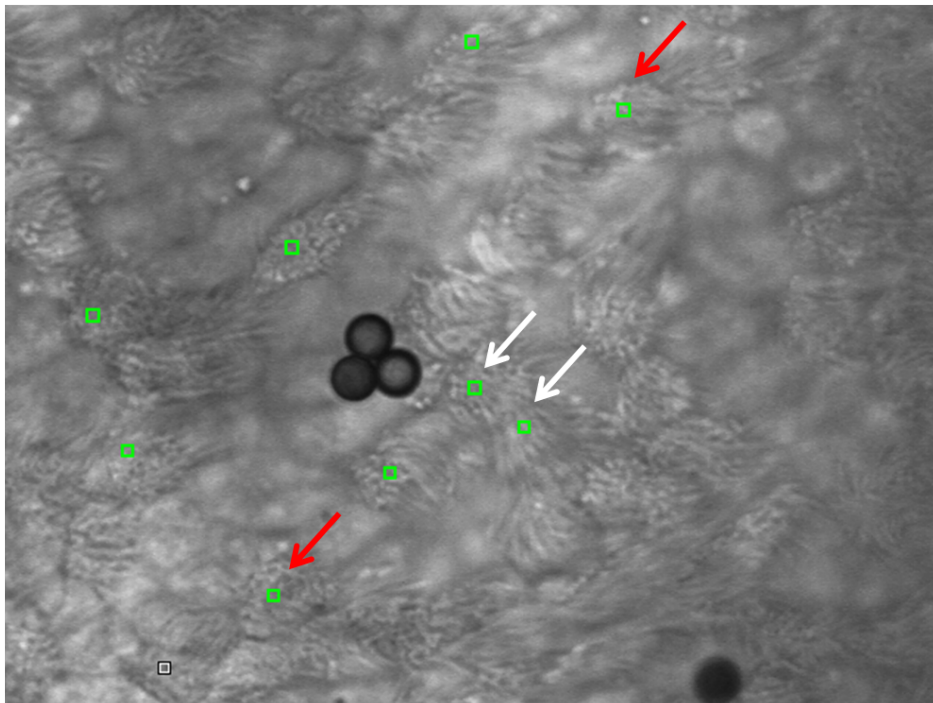


Abbildung 2.3: Blick auf das Trachealepithel mit zilientragenden Zellen (beispielhaft mit grünen Kästchen markiert). Um Unterschiede in der Zilienschlagfrequenz zwischen den Zellen zu finden, wurde zwischen benachbarten und nicht benachbarten Zellen unterschieden. Benachbarte Zellen grenzten direkt aneinander (weiße Pfeile). Nicht benachbarte Zellen hatten einen möglichst großen Abstand zueinander (rote Pfeile).

Beide Arten wurden gewählt, um zu eruieren, ob Berührungen benachbarter Zilien eine stärkere Regulation der Zilienschlagfrequenz auslösen als dies bei sich nicht berührenden, nicht benachbarten Zellen möglich ist. In jeder dieser Zellen wurde jeweils eine Stelle (8·8 Pixel) markiert, innerhalb derer die mittlere Helligkeit ermittelt wurde. Je nach Position der Zilien veränderten sich die Graustufen. Die so erzeugten Einzelwerte konnten mittels Fourier-Transformation mithilfe der Software Auto Signal v1.7 (Blue Stallion Technologies, Johannesburg, Südafrika) umgerechnet und auf diese Weise die Zilienschlagfrequenz der

einzelnen Zellen ermittelt werden. Stichprobenartig wurde durch manuelles Auszählen die ermittelte Zilienschlagfrequenz kontrolliert.

## 2.6 Stimulation von Epithelzellen

Den Stimulationsversuchen der Tracheen ging die oben beschriebene Präparation (s. Kap. 2.3) voraus. Im Unterschied zu den Transportversuchen wurden hierzu die Tracheen nach der Mukusspülung quer halbiert oder geviertelt und in der mit Sylgard ausgegossenen Kulturschale mit der Epithelseite nach oben flächig aufgespannt, wobei die Länge 0,4 bzw. 0,2 cm nicht überschritten und die Seitenränder spannungsfrei fixiert wurden. Danach erfolgte die Zugabe von Hepes-gepufferter Ringerlösung mit oder ohne Stimulans.

Die Stimulation der Epithelzellen fand zum Teil in einem Wärmeschrank mit Raumluft und zum anderen Teil in einem Wärmeschrank mit 5 % CO<sub>2</sub> statt. Dieser Unterschied, der eine Veränderung des pH-Werts bewirkt, wurde zum Teil durch die Hepes-gepufferte Ringerlösung ausgeglichen. Nach 2,5 h war der pH-Wert zwar etwas niedriger, doch ließ sich daraus weder ein Vorteil noch ein Nachteil hinsichtlich ihrer stimulatorischen Potenz für die eingesetzten Stoffe und Bakterien erkennen.

### 2.6.1 Lipopolysaccharid (LPS)

Zur Stimulation mit LPS (L4391 Lipopolysaccharid aus *E. coli* 0111:B4, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) wurde zu einer halbierten Trachea 2 µl LPS (Endkonzentration 1 µg/ml) vermisch mit 2 ml Hepes-gepufferter Ringerlösung gegeben. Die andere Kulturschale für die zweite Hälfte der Trachea enthielt nur 2 ml Hepes-gepufferter Ringerlösung. Anschließend wurde 2,5 h bei 37 °C und Raumluft inkubiert.

Für die indirekte Immunhistochemie wurde die Trachea in fünf etwa gleich große Stücke geteilt. Diese fünf Teile wurden 0, 15, 30, 45 oder 60 min in einem Reaktionsgefäß mit 1000 µl Hepes-gepufferter Ringerlösung, jeweils versetzt mit 1 µl LPS (Endkonzentration 1 µg/ml), im Wärmeschrank bei 37 °C inkubiert.

### 2.6.2 *Staphylokokkus aureus* (*S. aureus*)

Die Stimulation mit *S. aureus* (ATCC 29213) erfolgte mit  $1,41 \cdot 10^9$  cfu/halbe Trachea. *S. aureus* war jeweils am Vortag auf eine neue Agarplatte übertragen worden. Da McFarland 1 einer Menge von  $2,11 \cdot 10^9$  cfu/ml entspricht, wurden aus der erstellten Suspension 666 µl entnommen und zu 1333 µl Hepes-gepufferter Ringerlösung gegeben. Die Negativkontrolle wurde mit 2 ml Hepes-gepufferter Ringerlösung inkubiert. Anschließend wurde ebenfalls 2,5 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

### 2.6.3 *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*)

Pro Tracheahälfte wurde mit  $3,51 \cdot 10^8$  cfu *H. influenzae* NTHI 2019 (am 20.06.2002 von einem 60-jährigen COPD-Patienten mit invasiver Pneumonie gewonnen, B5144, 16S rRNA-Sequenzierung: Stamm Rd KW20) stimuliert. *H. influenzae* war jeweils am Vortag auf eine neue Blutagarplatte übertragen worden. Dazu wurden auch eine McFarland 1-Suspension mit *H. influenzae* erstellt (McFarland 1 enthält  $5,27 \cdot 10^8$  cfu/ml), daraus 666  $\mu$ l entnommen, mit 1333  $\mu$ l Hepes-gepufferter Ringerlösung vermischt und zur halben Trachea gegeben. Die Negativkontrolle wurde mit 2 ml Hepes-gepufferter Ringerlösung inkubiert. Die Inkubation dauerte ebenfalls 2,5 h bei 37 °C unter 5 % CO<sub>2</sub>.

Um die Auswirkung der Temperatur auf die intrazelluläre Entzündungsreaktion zu untersuchen, wurde eine Trachea geviertelt. Jeweils zwei Viertel wurden mit 333  $\mu$ l der McFarland 1-Suspension, vermischt mit 1666  $\mu$ l Hepes-gepufferter Ringerlösung, stimuliert (Endkonzentration  $1,76 \cdot 10^8$  cfu/viertel Trachea). Ein Viertel wurde bei 37 °C, das andere bei 24 °C jeweils für 2,5 h unter 5 % CO<sub>2</sub> stimuliert. Die zwei übrigen Viertel wurden als Negativkontrolle in 2 ml Hepes-gepufferter Ringerlösung inkubiert, jeweils ein Viertel bei 37 °C, das andere bei 24 °C.

Für die indirekte Immunhistochemie wurde die Trachea in fünf etwa gleich große Stücke geteilt. Diese fünf Teile wurden 0, 30, 60, 90 oder 120 min in einem Reaktionsgefäß mit jeweils  $1,40 \cdot 10^8$  cfu *H. influenzae* in 267  $\mu$ l Hepes-gepufferter Ringerlösung in einem Wärmeschrank bei 37 °C inkubiert (Endkonzentration  $1,41 \cdot 10^8$  cfu/fünftel Trachea).

### 2.6.4 Pam3Cys

Die Stimulation mit dem Toll-like-Rezeptor-2-Agonist Pam3Cys (L2000, Pam3Cys-SK44K3 HCl, EMC Microcollections, Tübingen) erfolgte an halbierten Tracheen in zwei verschiedenen Konzentrationen: 100 ng/ml und 10  $\mu$ g/ml. Die Stimulation mit 100 ng/ml Pam3Cys erfolgte wie die anderen Stimulationen in der Kulturschale in 2 ml Hepes-gepufferter Ringerlösung. Inkubiert wurde für 2,5 h bei 37 °C und Raumluft. Die Stimulation mit 10  $\mu$ g/ml Pam3Cys geschah in 1 ml Hepes-gepufferter Ringerlösung in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß. Bei dem zuletzt genannten Versuch geschah das Aufspannen der Tracheen in der mit Sylgard ausgegossenen Kulturschale erst nach Ablauf der Inkubationszeit. Auch diese betrug 2,5 h bei 37 °C und Raumluft.

### 2.6.5 Abhängigkeit der NF $\kappa$ B-Translokation und der mRNA-Regulation vom MyD88-Inhibitor

Für den Nachweis von Veränderungen auf mRNA-Ebene und für die indirekte Immunhistochemie wurden geviertelte Tracheen verwendet. Vor der Stimulation mit LPS fand eine 4 h dauernde Vorinkubation bei 37 °C und Raumluft im 1,5 ml-Eppendorfgefäß statt. Diese

erfolgte entweder mit einem MyD88-Inhibitor (MyD88 Homodimerization Inhibitory Peptide Set; IMGEX Corporation, San Diego, USA) oder einem Kontrollpeptid (MyD88 Homodimerization Inhibitory Peptide Set; IMGEX Corporation). Beide Proteine besaßen eine bestimmte Proteintransduktionssequenz (DRQIKIWFQNRRMKWKK), die es ihnen ermöglichte, die Zellmembran zu passieren. Es wurden 2 µl MyD88-Inhibitor bzw. Kontrollpeptid mit 98 µl HEPES-gepufferter Ringerlösung vermischt (Endkonzentration 0,05 mM).

Anschließend wurden die Proben für die mRNA-Gewinnung mit 2 µl LPS (Endkonzentration 1 µg/ml) in 2 ml HEPES-gepufferter Ringerlösung bzw. als Negativkontrolle mit HEPES-gepufferter Ringerlösung in der Kulturschale inkubiert. Die Stimulation dauerte 2,5 h und fand bei 37 °C und Raumluft statt. Für die indirekte Immunhistochemie wurden die vorinkubierten Proben in 1 µl LPS (1 mg/ml), vermischt mit 1 ml HEPES-gepufferter Ringerlösung bzw. in reiner HEPES-gepufferter Ringerlösung, im 1,5 ml-Eppendorfgefäß inkubiert. Dies dauerte 30 min und geschah bei 37 °C und Raumluft. Eine Übersicht über die Proben zeigt Tab. 2.1. Die Proben 3 und 4 entsprechen der Positiv- bzw. Negativkontrolle.

Tabelle 2.1: Übersicht über die Proben des Versuchs mit dem MyD88-Inhibitor und LPS

Probe	MyD88-Inhibitor/ Kontrollpeptid	LPS/ HEPES-gepufferte Ringerlösung
1	MyD88-Inhibitor	LPS
2	MyD88-Inhibitor	HEPES-gepufferte Ringerlösung
3	Kontrollpeptid	LPS
4	Kontrollpeptid	HEPES-gepufferte Ringerlösung

## 2.7 Neue Methode zur Epithelzellgewinnung

Um Aussagen über Entzündungsvorgänge nur in den Epithelzellen treffen zu können, wurde ein neues Verfahren entwickelt. Zur Gewinnung des Epithels kamen zwei verschiedene Arten von Tupfern und eine Ösenart zum Einsatz. Es zeigte sich, dass weder die Ausstrichöse noch der normale, sterile Polyestertupfer (BD Falcon\* SWUBE\* Single Polyester Applicator Collection Device, BD, folgend: Polyestertupfer) befriedigende Ergebnisse lieferten. Die beste Epithelzellgewinnung für die spätere quantitative Real-Time-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) wurde mit einem sterilen Copan-Tupfer (Collection Swab H268A; COPAN DIAGNOSTICS, Murrieta, USA; folgend: Copan-Tupfer) erreicht (s. Kap. 3.3). In der weiteren Arbeit wurde daher immer mit diesem Tupfer gearbeitet.

## 2.8 Epithelgewinnung zur Durchführung der qRT-PCR

Nach Ende der Inkubationszeit und Abnahme des Mediums wurde mit einem sterilen Copan-Tupfer mehrfach vorsichtig über das Epithel gestrichen und die so aufgenommenen Epithelzellen in einem 2 ml-Reaktionsgefäß in 353,5 µl vorgelegtem Reagenz (350 µl RA<sub>1</sub>-Reagenz (Total RNA Isolation, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) und 3,5 µl β-Mercaptoethanol) manuell resuspendiert. Nach Abschneiden des Tupferstiels konnte durch Vortexen und Zentrifugieren (~8.000 rpm) des Tupfers eine große Anzahl an Zellen gewonnen werden. Dabei zeigte sich, dass der Lysispuffer aus den abgetrennten Tupfern besonders effektiv wiedergewonnen werden konnte, indem der Tupfer separat in einer abgeschnittenen 1000 µl-Pipettenspitze in einem 2 ml-Reaktionsgefäß zentrifugiert (~3.500 rpm) wurde. Anschließend wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff auf -196 °C abgekühlt und danach bei -80 °C gelagert.

## 2.9 Vorbereitung und Durchführung der qRT-PCR

Um aus den gewonnenen Epithelzellen Aufschluss über die intrazelluläre Anzahl an mRNA-Kopien bestimmter Cytokine und Chemokine zu erhalten, wurde aus den Proben Gesamt-RNA isoliert und nach der reversen Transkription in die qRT-PCR eingesetzt.

### 2.9.1 RNA-Isolation

Die RNA-Isolation erfolgte mit dem Kit Total RNA Isolation (NucleoSpin<sup>®</sup> RNA II, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG) nach Angaben des Herstellers (Total RNA-Isolation 06-2009/Rev. 10). Dabei wurden die Epithelzellen nach Abnahme in 350 µl RA<sub>1</sub>-Reagenz und 3,5 µl β-Mercaptoethanol lysiert (s. Kap. 2.8). Anschließend wurde die Probe auf den NucleoSpin<sup>®</sup>-Filter eines Auffanggefäßes pipettiert und diese 1 min bei 11.000 g zentrifugiert. Danach wurde das Lysat mit 350 µl Ethanol (70 %) vermischt, auf eine neue NucleoSpin<sup>®</sup> RNAII-Säule im Auffanggefäß gesetzt und 30 s bei 11.000 g zentrifugiert. Das Lysat wurde verworfen. Auf die Säule wurden 350 µl *membrane desalting buffer* pipettiert und anschließend 1 min bei 11.000 g zentrifugiert. Für den DNA-Verdau wurden 10 µl *reconstituted rDNase* mit 90 µl *reaction buffer for rDNase* vermischt, 95 µl dieser Mischung auf die Säule pipettiert und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgten drei Wasch- und Zentrifugationsschritte. Zuerst wurden 200 µl RA<sub>2</sub>-Reagenz auf die Säule pipettiert, dann 30 s bei 11.000 g zentrifugiert. Daraufhin kamen 600 µl RA<sub>2</sub>-Reagenz auf die Säule, es folgte die Zentrifugation 30 s bei 11.000 g, dann das Pipettieren von 250 µl RA<sub>2</sub>-Reagenz auf die Säule und 2 min Zentrifugieren bei 11.000 g. Im letzten Schritt erfolgte das Eluieren der RNA in 60 µl RNase-freiem Wasser durch 1 min Zentrifugation bei 11.000 g. Die gewonnene RNA wurde bis zum Gebrauch bei -80 °C gelagert. Zur Messung der RNA-Menge erfolgte die photometrische

Konzentrationsbestimmung im Spectrophotometer (Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer, Thermo scientific, NanoDrop products, Wilmington, USA).

### 2.9.2 Reverse Transkription

Für das Umschreiben der mRNA in cDNA wurde das Transcriptor Reverse Transcriptase Kit (Roche, Mannheim) benutzt. Dabei wurden jeweils 5 µl der mRNA-Proben mit 6 µl H<sub>2</sub>O, 4 µl 5-fach *reaction buffer*, 2 µl PCR *nucleotide mix*, 2 µl *random primer*, 0,5 µl *protector RNase inhibitor* und 0,5 µl *transcriptor reverse transcriptase* versetzt und im Thermocycler (BIORAD C1000, Bio-Rad Laboratories GmbH, München) 10 min auf 25 °C, 60 min auf 50 °C, 5 min auf 85 °C erwärmt und anschließend auf 4 °C abgekühlt. Danach wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

### 2.9.3 qRT-PCR

Die qRT-PCR erfolgte im Light Cycler (Roche) mit dem LC Fast Start DNA Master SYBR Green Kit (Roche). Dazu wurde die SYBR-Green-Mischung in Reagenz 1b durch Zugabe aus 10 µl Reagenz 1a erstellt. Dabei enthielt Reagenz 1a Fast-Start-Enzym und Reagenz 1b Taq-Polymerase, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, dNTPs und SYBR Green. Danach wurden 2 µl der erstellten cDNA mit 12,6 µl H<sub>2</sub>O, 2,4 µl MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µl 20 µM des Vorwärts- und des Rückwärtsprimers (s. Anhang B) und 2 µl SYBR Green-Mischung (aus Reagenz 1a und 1b) versetzt und in Glaskapillaren pipettiert. Nach Zentrifugation der Glaskapillaren konnten diese in den Light Cycler eingesetzt werden. Hierbei erfolgte zunächst für 10 min die Erhitzung der Probe auf 95 °C, um die Taq-Polymerase zu aktivieren. Anschließend folgten 45 Zyklen der Amplifikation: jeweils 10 s Denaturierung bei 95 °C, 5 s Primerannealing bei 60 °C und 10 s Elongation bei 72 °C. Zur Kontrolle der qRT-PCR-Produkte wurde die Schmelzkurve erzeugt: Aufheizen auf 95 °C, 30 min Verbleiben bei 50 °C und Steigerung der Temperatur um 0,2 °C/s bis auf 95 °C, nach Abkühlen auf 40 °C Halten dieser Temperatur für 15 min. Als Housekeeping Gen wurde 18s rRNA gewählt.

## 2.10 Indirekte Immunhistochemie

Nach Stimulation der Trachea mit *H. influenzae* (s. Kap. 2.6.3), LPS (s. Kap. 2.6.1) bzw. MyD88-Inhibitor und LPS (s. Kap. 2.6.5) wurde jede Probe 10 min in 4 % Paraformaldehyd (PFA in PBS (2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 8,6 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12 H<sub>2</sub>O, 0,15 M NaCl), pH 7,3; Merck KGaA) fixiert. Danach wurde 3 x 10 min in Tris-buffered Saline (TBS; TRIS 0,05 M (Merck KGaA), Tween<sup>®</sup>20 0,05 % (w/v) (Merck KGaA), NaCl 0,86 % (w/v) (Carl Roth GmbH & Co. KG) in Aqua bidest., pH 7,6) gewaschen, anschließend 10 min bei -20 °C in Aceton fixiert, um sie dann erneut 3 x 10 min in TBS zu spülen. Nachdem im Vorversuch die

richtige Antikörperkonzentration des Primärantikörpers gegen NF $\kappa$ B p65 ermittelt werden konnte, wurden die Tracheastücke in einem Reaktionsgefäß in 100  $\mu$ l anti NF $\kappa$ B p65 (monoklonal; Kaninchen/Klon C22B4; 1:50; Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA) in TBS über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte nach 3 x 10 min TBS-Spülen die Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur in einem Reaktionsgefäß mit 100  $\mu$ l des Sekundärantikörpers (Anti-Kaninchen IgG aus Esel; Alexa Fluor 555; 1:800; Invitrogen) in TBS, worauf wieder 3 x 10 min TBS-Spülen erfolgte. Zur Darstellung der Zellkerne wurde zusätzlich noch 10 min mit 100  $\mu$ l 1:10.000 Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) in TBS im Reaktionsgefäß gefärbt, gefolgt von 3 x 10 min TBS-Spülung. Nach beendeter Färbung und Spülung wurde jedes Tracheastück auf einem Deckgläschen der Größe 24 mm·32 mm auf die Tracheaaußenseite gelegt, darauf vorsichtig Mowiol (12 g Mowiol (Höchst), 30 ml Aqua dest., 60 ml Tris-Puffer 0,2 mol (2,90 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Merck KGaA), 120 ml Aqua bidest, pH 8,5, 30 g fluoreszenzfreies Glycerin (Merck KGaA), pH 8,5) getropft und durch Auflegen eines zweiten Deckgläschens das Tracheastück möglichst blasenfrei ausgebreitet. Nach etwa 24 h Trocknen wurden die verklebten Deckgläschen auf einem Objektträger fixiert. Anschließend wurden die Proben mit einem Wasserimmersionsobjektiv mit 40-facher Vergrößerung (C-Apochromat 40x/1.2 W corr, Carl Zeiss MicroImaging, GmbH) im konfokalen Laserscanningmikroskop (LSM 510 Meta, Carl Zeiss) untersucht. Die Darstellung der zilientragenden Zellen gelang über die Detektion von Durchlicht. Anschließend wurden die Bilder mit dem LSM Image Browser (Release 4.2 Carl Zeiss MicroImaging GmbH) editiert. Um die Anzahl der Zellkerne mit erfolgter NF $\kappa$ B p65-Translokation zu quantifizieren, wurden pro Versuch in einem Gesichtsfeld sämtliche Zellkerne, durchschnittlich 154, ausgezählt. Anschließend erfolgte das Zählen der Zellkerne mit sicher zu erkennender NF $\kappa$ B p65-Translokation in den Zellkern, um schließlich aus diesen beiden Parametern ein prozentuales Verhältnis bilden zu können.

## 2.11 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung

Zur Kontrolle der Epithelabnahmen wurden die Tracheen nach Abstreifen des Epithels mit den verschiedenen Tupper- und Ösenarten für drei Tage im Kühlschrank fixiert (Fixans nach Monti-Graziadei: 0,06 M Natrium-Cacodylat-Puffer (Merck KGaA), 2% Glutaraldehyd (Sigma-Aldrich Chemie GmbH), 0,6% Paraformaldehyd (Merck KGaA), 0,03% CaCl<sub>2</sub> (Merck KGaA), pH 7,35). Anschließend erfolgte das Spülen im 0,1 M Cacodylatpuffer (0,2 M Dimethylarsinsäurenatriumsalz, 0,2 M Saccharose, in Aqua bidest., pH 7,4) für einige Minuten, wobei der Puffer bei diesem Procedere zwei- bis dreimal ausgetauscht wurde. Danach wurden die Proben in einer aufsteigenden Acetonreihe (Carl Roth GmbH & Co. KG) entwässert. Dabei wurde in 10%-Schritten bei 30% startend jeweils für einen halben Tag entwässert (30-90%, insgesamt 3,5 Tage), in 100% Aceton für einen ganzen Tag. Die Präparate wurden direkt aus dem 100% Aceton mithilfe der Kritischen-Punkt-Trocknung bearbeitet. Nach Abschluss der Trocknung wurden die Präparate auf Probenhalter aufgeklebt und in

der Sputteranlage (POLARON SEM COATING SYSTEM, Polaron Instruments, Lewes, England bzw. BALZERS UNION SCD 040, Balzers Union, Balzers, Lichtenstein) mit Gold bzw. Platin besputtert. Daraufhin konnten die Proben im Rasterelektronenmikroskop (SEM 505, Philips/FEI, Eindhoven, Niederlande) bei einer Spannung von 22 kV analysiert werden.

## 2.12 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung der gepaarten Stichproben wurde der Wilcoxon-Test benutzt. Die Berechnung erfolgte hierbei mithilfe eines Excel-Sheets (McDonald, 2009), dessen Richtigkeit durch stichprobenartiges Kontrollrechnen in SPSS 17 (SPSS, IBM, Ehningen) überprüft wurde. Die Signifikanz ungepaarter Proben wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test in SPSS berechnet. Alle Werte sind mit einer Ausnahme als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben. Bei dieser Ausnahme handelt es sich um die Untersuchung der Zilienschlagfrequenzen bei Temperaturveränderungen. Dort sind sowohl die Einzelwerte als auch der Mittelwert der sechs Versuche angegeben. Zur Genauigkeitsüberprüfung der Näherungsfunktion wurde das Bestimmtheitsmaß berechnet. Wenn nicht besonders vermerkt, lag das Signifikanzniveau immer bei  $p = 0,05$ .

Für die statistische Auswertung der Diskontinuität der Transportgeschwindigkeit von Dynabeads wurden paarweise Tests durchgeführt. Nach Durchführung des Kruskal-Wallis-Tests (SPSS) und Aufstellung einer Hierarchie und Hypothesenbildung wurde nach Maurer und Lehmacher (1995) bei positivem Ergebnis des Kruskal-Wallis-Test im Anschluss noch der U-Test (SPSS) durchgeführt. Auch hierbei lag das Signifikanzniveau bei  $p = 0,05$ .

Um zu klären, ob eine Zugabe von ATP auch in größeren Abständen vom Epithel zu einer Erhöhung der Transportgeschwindigkeit führte, wurde der Wilcoxon-Test verwendet. Da es sich um multiple Tests handelte, wurde das Signifikanzniveau nach Bonferroni korrigiert (Signifikanzniveau =  $0,05 / \text{Anzahl der Tests}$ ).

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Transport von Partikeln und Bakterien

Mithilfe der zuvor beschriebenen Verfahren wurden im ex-vivo Modell der murinen Trachea Partikel und Bakterien verschiedener Größe und Art auf ihre Transporteigenschaften hin untersucht. Da die Transportfilme nur in Bruchteilen als Ausschnitt in dieser Arbeit enthalten sein können, befindet sich auf einer separaten DVD eine Sammlung ausgewählter Filme. Sämtliche Filme befinden sich im Institut für Anatomie der Universität zu Lübeck.

#### 3.1.1 Transport von Polystyrenpartikeln

Die Versuche mit Dynabeads-Zusatz zeigten, dass Dynabeads auch nach Entfernung von Mukus und Ersetzen der natürlichen periziliären Flüssigkeit durch ein Übermaß Hepesgepufferter Ringerlösung transportiert wurden. Der Transport konnte nicht nur auf Höhe des Epithels, sondern bis 400  $\mu\text{m}$  darüber beobachtet werden. Dabei ließ sich ein Hauptstrom über den Zilien beobachten. Dieser war dadurch charakterisiert, dass dort der Großteil der Partikel vergleichbar dem Verkehr auf einer Straße transportiert wurde (s. Abb. 3.1; Nachweis in  $n = 12$  Tieren).

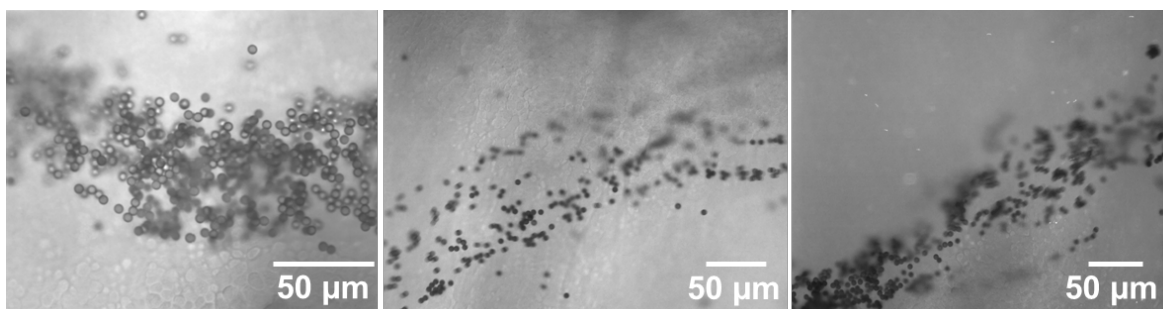


Abbildung 3.1: Transport von Polystyrenpartikeln in straßenartiger Konfiguration. Ausschnitte aus drei verschiedenen Filmen. Nachweis in  $n = 12$  Tieren (s. Anhang C, Filme 1-3 Abb. 3.1).

Trotz sorgfältigen Spülens der Trachea konnten einzelne Mukusfäden bzw. -stücke nicht immer entfernt werden bzw. bildeten sich wieder neu. Aufgrund dessen war es möglich, den Einfluss des Mukus auf das Transportverhalten von Dynabeads zu eruieren. Dabei zeigte

sich, dass Mukus zwar Dynabeads, Erythrozyten, Schmutz und abgestorbene Zellen außerhalb des Epithelverbundes mitriss, dass aber Mukusstücke, die größer als Dynabeads waren, nicht so schnell wie diese transportiert wurden (s. Abb. 3.2; Nachweis in  $n = 6$  Tieren).

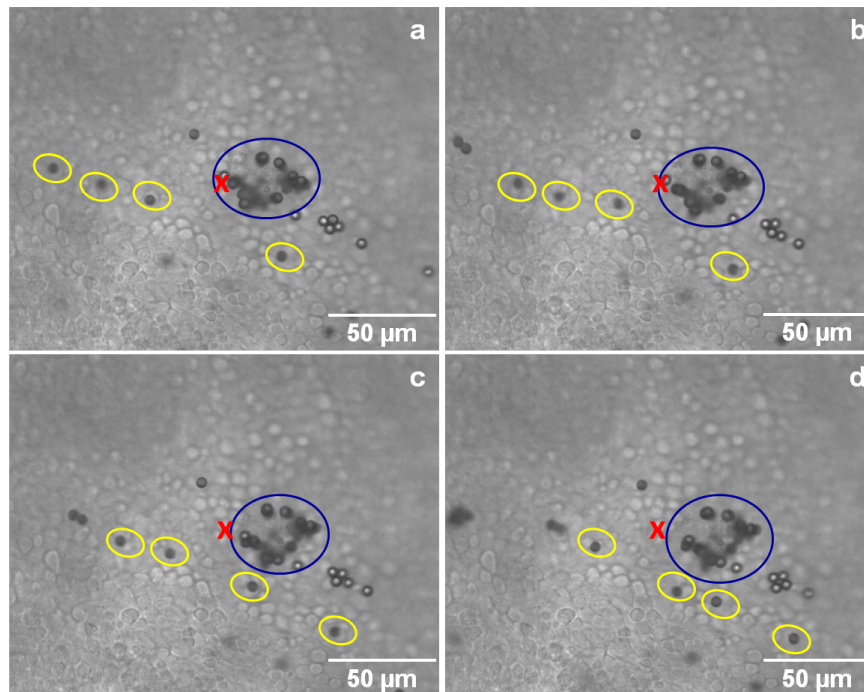


Abbildung 3.2: Transport von Polystyrenpartikeln innerhalb (blau umrandet) und außerhalb (gelb umrandet) eines Mukusstücks. Das rote Kreuz stellt den Mittelpunkt des Bildes dar und verdeutlicht, dass der Transport der Partikel außerhalb des Mukusstücks deutlich schneller ist. Nachweis in  $n = 6$  Tieren. Zeitspanne von (a)-(d): 1 s, (s. Anhang C, Film Abb. 3.2).

### 3.1.1.1 Veränderung der Transportgeschwindigkeit mit zunehmendem Abstand zum Epithel

Die Transportgeschwindigkeit der Dynabeads war auf Höhe des Epithels am größten und nahm stetig mit zunehmender Entfernung von ihm ab, bis kein Transport mehr nachweisbar war. Dabei sank die Transportgeschwindigkeit von durchschnittlich  $37,89 \mu\text{m/s}$  ( $\pm 0,74 \mu\text{m/s}$ ; auf Epithelhöhe) auf  $18,84 \mu\text{m/s}$  ( $\pm 1,33 \mu\text{m/s}$ ;  $400 \mu\text{m}$  über dem Epithel; s. Abb. 3.3, nächste Seite). Der gerichtete Transport  $400 \mu\text{m}$  über dem Epithel konnte an vier der fünf Tracheen beobachtet werden. Somit unterschied sich die Transportgeschwindigkeit auf Epithelhöhe signifikant von der Transportgeschwindigkeit  $400 \mu\text{m}$  über dem Epithel ( $p < 0,001$ ). Nach Zugabe von  $20 \mu\text{l}$   $10 \text{ mM}$  ATP (Endkonzentration  $100 \mu\text{M}$ ) wurde die Transportgeschwindigkeit hochreguliert. Dabei stiegen die Geschwindigkeiten auf  $80,82 \mu\text{m/s}$  ( $\pm 1,01 \mu\text{m/s}$ ; auf Epithelhöhe) und auf  $36,10 \mu\text{m/s}$  ( $\pm 1,33 \mu\text{m/s}$ ;  $400 \mu\text{m}$  über dem Epithel). In den Versuchen mit ATP konnte sogar an allen fünf Tracheen ein gerichteter Transport  $400 \mu\text{m}$  über dem Epithel beobachtet werden. In beiden Versuchen nahmen die Transportgeschwindigkeiten von

einer Entfernungsstufe zur nächsthöheren Stufe stetig ab. Die Transportgeschwindigkeiten waren bei Vergleich der Versuche mit bzw. ohne ATP bis 400  $\mu\text{m}$  signifikant unterschiedlich ( $p = 0,001$  bzw.  $p = 0,005$ ; s. Abb. 3.3).

Der Vergleich der Transportgeschwindigkeiten zeigte, dass die Geschwindigkeit 400  $\mu\text{m}$  über dem Epithel im ATP-Versuch in etwa der Geschwindigkeit 0  $\mu\text{m}$  über dem Epithel im Versuch ohne ATP entsprach (s. Abb. 3.3). Außerdem reduzierte sich – sowohl im Versuch mit als auch ohne ATP – die Transportgeschwindigkeit von Epithelhöhe (0  $\mu\text{m}$ ) bis 400  $\mu\text{m}$  darüber jeweils um die Hälfte (s. Abb. 3.3).

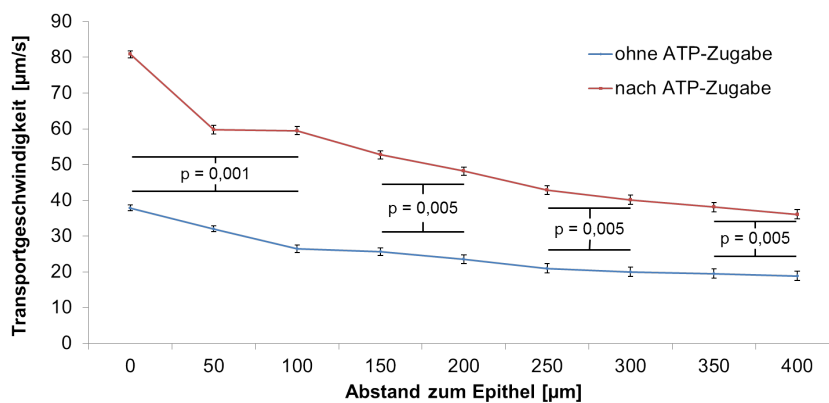


Abbildung 3.3: Veränderung der Transportgeschwindigkeit mit zunehmendem Abstand zum Epithel. Es wurde der Verlauf der Transportgeschwindigkeit in 50  $\mu\text{m}$ -Schritten von der direkten Epitheloberfläche (= 0  $\mu\text{m}$ ) bis 400  $\mu\text{m}$  über dieser Ebene gemessen. Jede Messung wurde im selben Tier sowohl ohne ATP- als auch mit ATP-Zugabe durchgeführt. Nachweis in  $n = 20$  Messungen aus 5 Tieren. Angaben als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. Es wurden vier statistische Tests (Wilcoxon) durchgeführt. Das nach Bonferroni korrigierte Signifikanzniveau lag bei  $p = 0,0125$ .

Bei genauerer Betrachtung des Verlaufs der Transportgeschwindigkeit ließ sich sowohl im Versuch ohne ATP- als auch im Versuch mit ATP-Zugabe erkennen, dass ein logarithmischer Zusammenhang (s. Abb. 3.4) zwischen der Abnahme der Transportgeschwindigkeit und dem Abstand zum Epithel bestand.

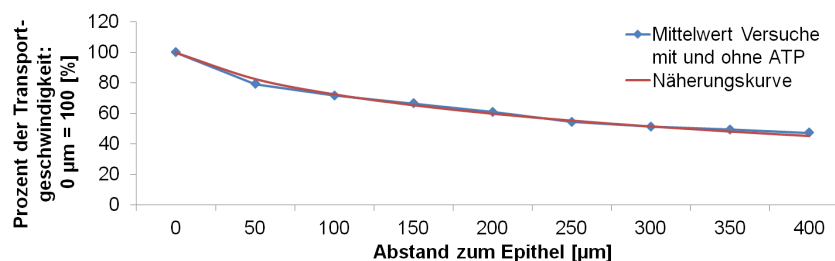


Abbildung 3.4: Abnahme der prozentualen Transportgeschwindigkeit von Dynabeads bei Entfernung vom Epithel. Die Geschwindigkeit auf Höhe des Epithels wurde 100% gleichgesetzt. In die Ergebnisse sind die Transportgeschwindigkeiten beider Versuche (mit und ohne ATP-Zugabe) eingeflossen. Geschwindigkeit  $v(\text{Abstand})[\%] = 100 - 25\ln(1 + \text{Abstand}[\mu\text{m}]/50[\mu\text{m}])$ ;  $R^2 = 0,9931$ . Nachweis in  $n = 20$  aus 5 Tieren.

Bei Mittelwertbildung der prozentualen Reduktionen des ATP- und des Nicht-ATP-Versuchs konnte mithilfe von Excel folgende Näherungsgleichung für die Transportgeschwindigkeit  $v$  hergeleitet werden:  $v(\text{Abstand})[\%] = 100 - 25\ln(1 + \text{Abstand}[\mu\text{m}]/50[\mu\text{m}])$ . Das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  betrug hierbei 0,9931.

### 3.1.1.2 Diskontinuität der Transportgeschwindigkeit

Da insbesondere in den 471 Hz-Aufnahmen der Eindruck entstand, dass der Transport nicht mit einer konstanten Geschwindigkeit ablief, wurde in diesem Versuch nicht mit einer Gesamttransportgeschwindigkeit eines Partikels, sondern mit dessen Einzeltransportgeschwindigkeiten gearbeitet. Dabei fiel auf, dass der Dynabeads-Transport keinesfalls mit konstanter Geschwindigkeit erfolgte, sondern sich die Einzeltransportgeschwindigkeiten stark voneinander unterschieden (s. Abb. 3.5).

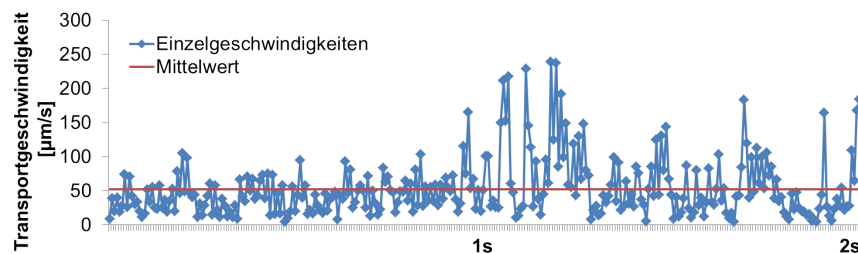


Abbildung 3.5: Variabilität der Transportgeschwindigkeit eines einzelnen Polystyrenpartikels. Dargestellt sind sowohl der Mittelwert aller Geschwindigkeiten als auch die jeweilige Partikeleinzelschwindigkeit, berechnet immer aus der Differenz zweier benachbarter Bilder aus einem Transportfilm. Nachweis in  $n = 12$  Tieren.

Diese Variationen der Einzelgeschwindigkeiten konnte über alle Entfernungsstufen beobachtet werden. Die größten Schwankungen existierten auf Höhe des Epithels (s. Abb. 3.6, nächste Seite).

Dort lagen die Einzelwerte eines Partikels durchschnittlich 2,68-fach ( $\pm 0,09$ ) über bzw. unter seiner mittleren Geschwindigkeit. 25  $\mu\text{m}$  über dem Epithel sank diese Variationsbreite auf das  $\pm 1,86$ -fache ( $\pm 0,15$ ) der mittleren Geschwindigkeit. Bei weiterer Entfernung vom Epithel stieg die Variationsbreite von  $\pm 2,02$  (50  $\mu\text{m}$ :  $\pm 0,17$ ) auf  $\pm 2,23$  (75  $\mu\text{m}$ :  $\pm 0,26$ ) und auf  $\pm 2,39$  (100  $\mu\text{m}$ :  $\pm 0,34$ ). Diese Veränderungen ließen sich auch in den Videos nachvollziehen (s. Abb. 3.7, nächste Seite). Direkt auf Höhe des Epithels konnte beobachtet werden, dass die Transportgeschwindigkeit auch abhängig davon war, zu welchem Zeitpunkt im Schlagzyklus der zilientragenden Zelle ein Partikel diese erreichte. Traf ein Partikel während des *effective stroke* auf eine zilientragende Zelle, wurde er unvermittelt weitertransportiert und beschleunigt. Erreichte er aber dieselbe Zelle während des *recovery stroke*, wurde der Partikel nicht weitertransportiert, sondern sogar ein Stück zurückbewegt (s. Abb. 3.7). Im anschließenden *effective stroke* erfolgte dann wieder der Transport in die eigentliche Richtung.

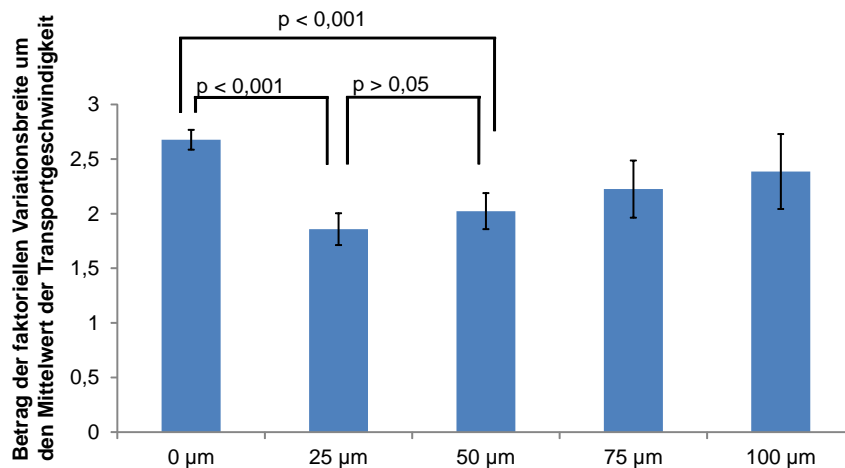


Abbildung 3.6: Durchschnittliche Variationsbreite der einzelnen Transportgeschwindigkeiten eines Dynabeads bezogen auf den Mittelwert seiner Transportgeschwindigkeit. Untersucht wurde die Veränderung dieser Variationsbreite innerhalb eines Tieres bei Entfernung vom Epithel (0 bis 100 µm). Nachweis in  $n=30$  Messungen aus 3 Tieren. Angaben als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. Nach Durchführung des Kruskal-Wallis-Tests sowie anschließender Aufstellung einer Hierarchie und Hypothesenbildung wurde bei positivem Ergebnis des Kruskal-Wallis-Tests der U-Test nach Maurer und Lehmacher (1995) durchgeführt.

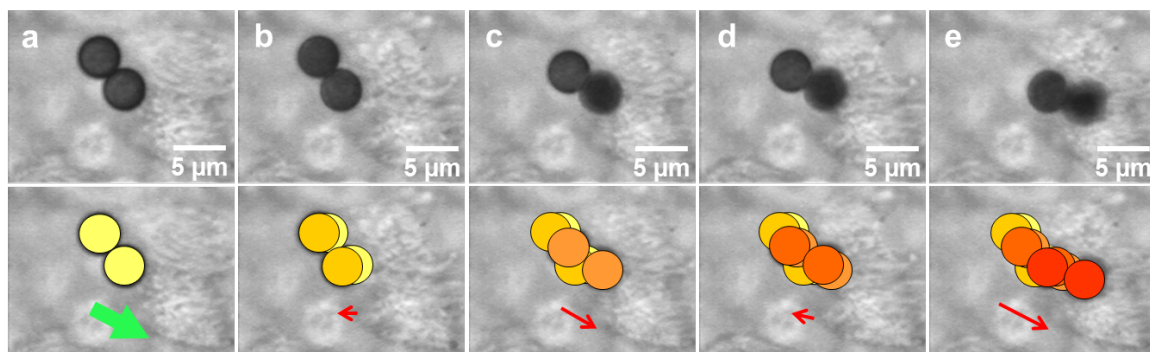


Abbildung 3.7: Direkter zilienvermittelter Transport von Polystyrenpartikeln. Dargestellt sind Ausschnitte aus einem Film. Dort werden zwei Polystyrenpartikel transportiert, die sich in der Reichweite einer zilientragenden Zelle befinden. Die obere Reihe zeigt die Bilder im Original, in der unteren Reihe sind die jeweils vorherigen Positionen der Partikel markiert. Dabei stellen die hellen Gelbtöne den Anfang der Transportsequenz dar und werden bis zu ihrem Ende immer dunkler. Der grüne Pfeil symbolisiert die Haupttransportrichtung der gesamten Trachea. Zunächst treffen die Partikel während des *recovery stroke* auf die Zelle und werden gegen die bisherige Transportrichtung bewegt (b, roter Pfeil). Während des *effective stroke* werden sie wieder in die eigentliche Transportrichtung bewegt (c, roter Pfeil). Dieses Phänomen wiederholt sich während des nächsten *recovery* (d, roter Pfeil) bzw. *effective stroke* (e, roter Pfeil). Nachweis in  $n=12$  Tieren. Zeitspanne von (a)-(d): 0,1 s (s. Anhang C, Film Abb. 3.7).

### 3.1.1.3 Grenzen des zilienvermittelten Transports

Die Versuche mit Dynabeads-Zusatz zeigten, dass Dynabeads auch nach Entfernung von Mukus und Ersetzen der natürlichen periziliären Flüssigkeit durch ein Übermaß an Hepes-

gepufferter Ringerlösung transportiert wurden und nur vereinzelt liegen blieben. Allerdings blieben nur Dynabeads liegen, die nicht im Hauptstrom oberhalb der Zilien transportiert wurden, d. h. die etwas abgesunken waren und schon an Geschwindigkeit verloren hatten (s. Abb. 3.8). Diese liegen gebliebenen Dynabeads konnten entweder unbeweglich auf die nicht-zilientragenden Zellen absinken oder zwar absinken, jedoch von anderen zilientragenden Zellen noch erreicht werden, wodurch die Partikel rotierten. Prädilektionsstellen für das Absinken von Dynabeads waren Areale, in denen entweder keine intakten zilientragenden Zellen mehr existierten, beispielsweise durch Traumata während oder vor der Präparation ausgelöst, oder weniger zilientragende Zellen (im Verhältnis zu nicht-zilientragenden Zellen) vorhanden waren. Aus solchen Arealen konnten sie durch Aufwirbeln mittels Pipette wieder in den Hauptstrom gebracht werden. Selbst nach Entfernung sämtlicher liegen gebliebener Dynabeads lagerten sich aber nach wenigen Sekunden wieder neue ab. Somit existierte an diesen Stellen nicht nur ein temporäres, sondern ein dauerhaftes Problem des Transports.

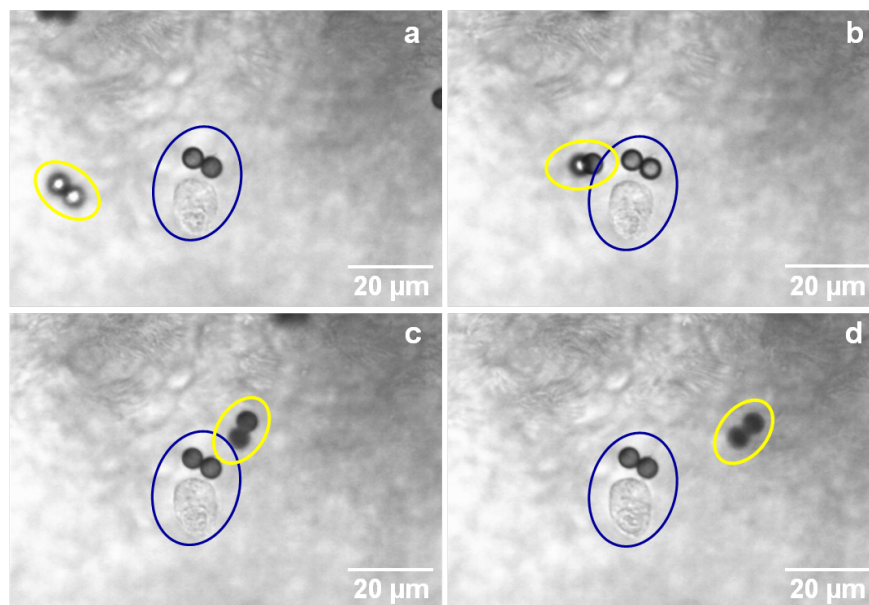


Abbildung 3.8: Grenzen des zilienvermittelten Transports. Blau umrandet sind zwei Dynabeads und eine abgestorbene Epithelzelle, die stationär sind und nicht transportiert werden. Parallel dazu, gelb umrandet, werden um diese Stelle mit schwachen Transporteigenschaften zwei weitere Dynabeads befördert, erkennbar an deren Positionsveränderungen von Bild (a) bis (d). Nachweis in  $n = 7$  Tieren. Zeitspanne von (a)-(d): 1 s (s. Anhang C, Film Abb. 3.8).

### 3.1.2 Transport von Bakterien

*E. coli* und *S. epidermidis* wurden als Vertreter der gram-negativen bzw. gram-positiven Bakterien in das ex-vivo Modell der Trachea eingesetzt. Sie wurden trotz Mukusentfernung und Ersetzen der periziliären Flüssigkeit durch ein Übermaß an Hepes-gepufferter Ringerlösung transportiert (s. Abb. 3.9, nächste Seite).

Auch beim Transport der Bakterien ließen sich die bereits beschriebenen zwei verschiedenen Transportmechanismen erkennen. So wurden einerseits Bakterien mit dem Hauptstrom transportiert. Dies geschah mit einem gewissen Abstand zum Epithel, ohne dieses also zu berühren. Außerdem wurden sie direkt auf Höhe des Epithels transportiert. Der Transport auf Epithelhöhe wurde zwar nicht in ihre Einzeltransportgeschwindigkeiten zerlegt, dennoch konnte sicher beobachtet werden, dass die Transportgeschwindigkeit nicht konstant war.

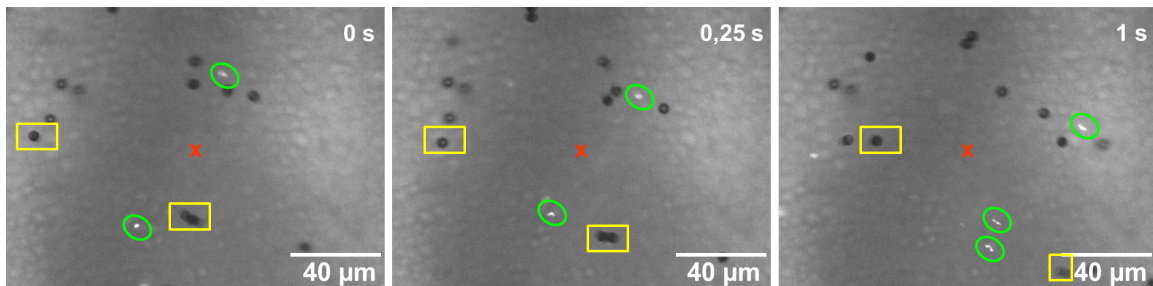


Abbildung 3.9: Transport von Dynabeads und Bakterien (*E. coli* und *S. epidermidis*) trotz Entfernung von Mukus. Um den Transport von Bakterien (grüne Markierung) zu untersuchen, wurden sie mit Dynabeads (gelbe Markierung) parallel eingesetzt, um so einen direkten Vergleich zu ermöglichen. Der Bildmittelpunkt (rotes Kreuz) dient zur besseren Sichtbarkeit der zurückgelegten Strecke. Nachweis in  $n = 6$  Tieren (s. Anhang C, Film Abb. 3.9).

Bei Vergleich der Transportgeschwindigkeiten von Dynabeads und Bakterien ließen sich keine signifikanten Unterschiede feststellen ( $p > 0,2$ ). Bakterien wurden durchschnittlich mit  $47,12 \mu\text{m/s}$  ( $\pm 0,49 \mu\text{m/s}$ ) und Dynabeads mit durchschnittlich  $45,20 \mu\text{m/s}$  ( $\pm 0,51 \mu\text{m/s}$ ) befördert (s. Abb. 3.10).

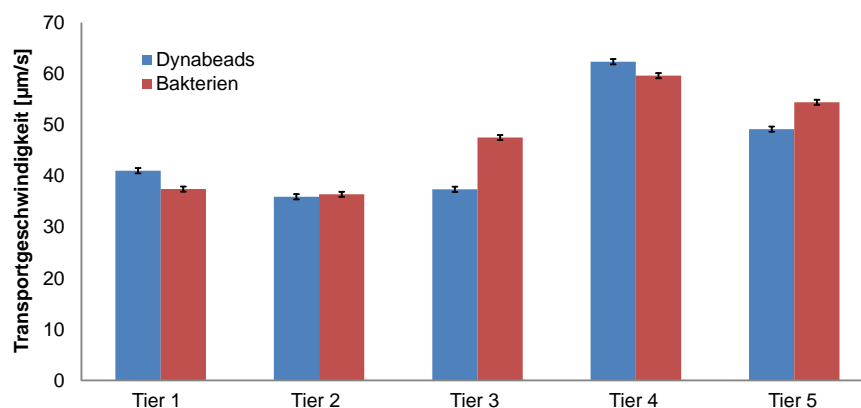


Abbildung 3.10: Durchschnittliche Transportgeschwindigkeit von Dynabeads und Bakterien (*E. coli* und *S. epidermidis*). Nachweis in  $n = 5$  Tieren. Vergleich der Transportgeschwindigkeit der Dynabeads eines Versuchs mit der Transportgeschwindigkeit der Bakterien desselben Versuchs,  $p > 0,2$ . Angaben als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. Durchführung des Wilcoxon-Tests.

Allerdings ließ sich ein Unterschied bezüglich des Anhaftens an das Epithel erkennen. Die verwendeten Bakterien blieben im Gegensatz zu den Dynabeads eher an den Spitzen der

Zilien kleben (s. Abb. 3.11), sie schienen in der vitalen ex-vivo Trachea keinen permanenten Kontakt zu den nicht-zilientragenden Zellen zu haben. Erst bei Zusammenbruch des Transports sanken Bakterien auf nicht-zilientragende Zellen ab. Der Zusammenbruch des Transports wurde durch Erhitzen der Trachea auf 44 °C und somit durch Überschreiten der Hitzetoleranzschwelle der Zellen erreicht. Im Gegensatz zu liegen gebliebenen Dynabeads konnten festgesetzte Bakterien nicht durch Aufwirbeln mit einer Pipette in den Hauptstrom zurückgeführt werden. Die haftenden Bakterien wurden bei allen Zilienbewegungen mitbewegt und konnten sich nur in Ausnahmefällen wieder von den Zilien lösen. Insgesamt konnte in allen sieben Tieren mehrfach ein Anhaften an den Zilien beobachtet werden.

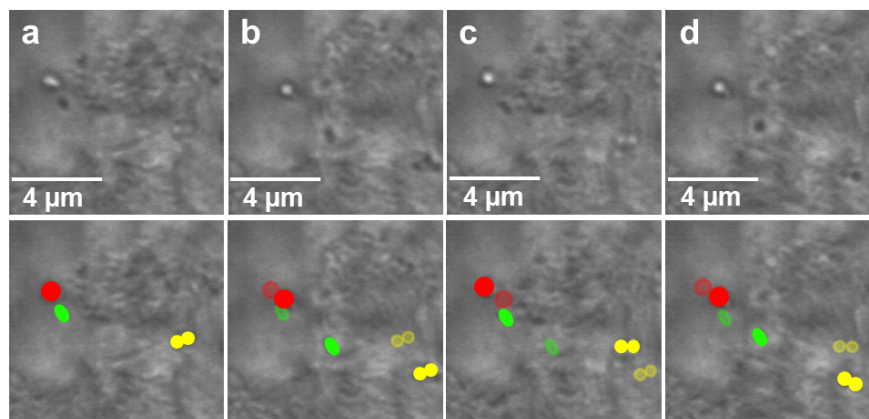


Abbildung 3.11: Bilderfolge von Bakterien (farbig umrandet), die an Zilien kleben und bei jedem Zilienschlag mitbewegt werden, erkennbar an ihrer veränderten Position (a)-(d). Die blässeren Farben entsprechen der Position des Vorbilds. Zeitspanne von (a)-(d): 1 s. Nachweis in n = 7 Tieren (s. Anhang C, Film Abb. 3.11).

### 3.1.3 Transport von Fluoresbrite-Partikeln

Fluoresbrite-Partikel (0,20 µm) wurden ebenfalls nach Entfernung von Mukus und Ersetzen der periziliären Flüssigkeit durch Hepes-gepufferte Ringerlösung transportiert. Mit zunehmender Inkubationszeit konnte beobachtet werden, dass sie häufig am Epithel hafteten (s. Abb. 3.12, nächste Seite). Aufgrund der geringen Größe der Fluoresbrite-Partikel konnte bei ihnen allerdings nicht direkt gezeigt werden, dass sie vorzugsweise an den Zilien kleben blieben. Die avitalen Fluoresbrite lagen im Unterschied zu den größeren Dynabeads nicht bewegungslos auf dem Epithel. Vielmehr machten sie immer ziliotypische Bewegungen. Indirekt lässt sich somit also schließen, dass sie offenbar an den zilientragenden Zellen hingen.

#### 3.1.3.1 Mukusfäden

Zu Beginn des Versuchs wurde durch Spülen mit Hepes-gepuffertes Ringerlösung Mukus entfernt. Konnte durch das Spülen nicht der gesamte Mukus beseitigt werden, fanden sich

dennoch zu Beginn des Versuchs höchstens noch kleine Stücke davon. Nach Zugabe von Fluoresbrite veränderte sich dies und es tauchten einzelne Mukusfäden auf. Diese oftmals sehr langen Fäden zogen sich durch das gesamte Blickfeld und ermöglichten z. T. eine Vernetzung zwischen den Zellen (s. Abb. 3.13), stellten jedoch keine durchgehende Mukusschicht dar.

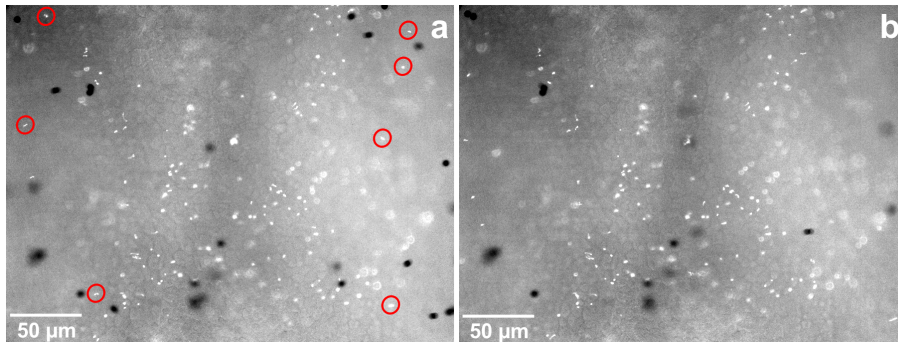


Abbildung 3.12: Anheftungsverhalten von Fluoresbrite-Partikeln an murinem Trachealepithel. Bild (a) zeigt rot umrandete Fluoresbrite, die nicht stationär sind und daher auf Bild (b) nicht mehr an der gleichen Stelle zu finden sind. Die übrigen Fluoresbrite haben ihre Position nicht verändert. Es zeigt sich eine große Ansammlung haftender Fluoresbrite. (a)-(b): 7 s. Nachweis in  $n = 5$  Tieren (s. Anhang C, Film Abb. 3.12).

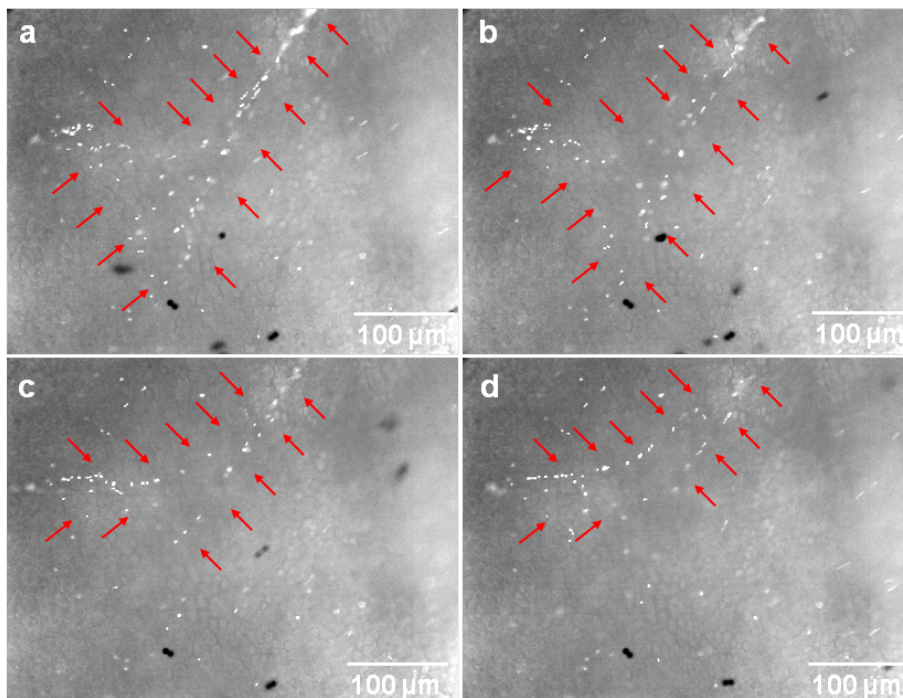


Abbildung 3.13: Bilderfolge des Transports eines Mukusfadens mit vielen langen Ausläufern (rote Pfeile), die nicht zu enden scheinen. Der Faden enthält Fluoresbrite (helle Punkte), die die Gestalt des Mukus erahnen lassen. Dieser zunächst sehr flächige Faden wird nach rechts oben gezogen und verjüngt sich dabei. Die dunklen Punkte entsprechen Dynabeads. Zeitspanne von (a)-(d), 7 s. Nachweis in  $n = 12$  Tieren (s. Anhang C, Film Abb. 3.13).

### 3.1.3.2 Vergleich der Transportgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Partikelgröße: Dynabeads und Fluoresbrite

Die Transportgeschwindigkeiten von Dynabeads und Fluoresbrite unterschieden sich signifikant ( $p < 0,001$ ). In fünf Versuchen konnte gezeigt werden, dass die durchschnittliche Transportgeschwindigkeit von Dynabeads mit  $51,51 \mu\text{m/s}$  ( $\pm 1,59 \mu\text{m/s}$ ; s. Abb. 3.14a, ohne ATP-Zugabe) bzw. mit  $74,73 \mu\text{m/s}$  ( $\pm 1,29 \mu\text{m/s}$ ; s. Abb. 3.14b, nach ATP-Zugabe) höher war als die von Fluoresbrite. Fluoresbrite wurden somit durchschnittlich 11,80 % bzw. nach ATP-Zugabe 9,76 % langsamer als Dynabeads transportiert.

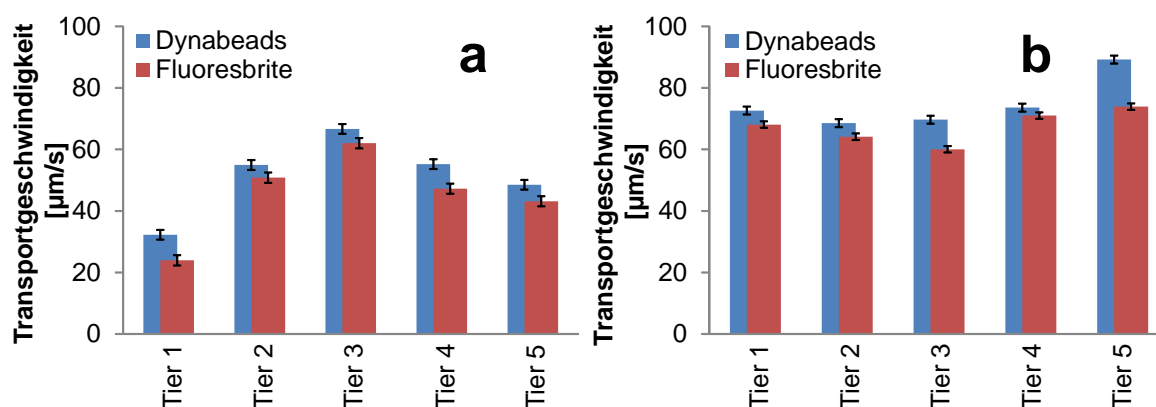


Abbildung 3.14: Durchschnittliche Transportgeschwindigkeit von Dynabeads und Fluoresbrite. Ohne Zugabe von ATP (a), nach Zugabe von ATP (b). Nachweis in  $n=5$  Tieren. Vergleich der Transportgeschwindigkeit der Dynabeads eines Versuchs auf die Transportgeschwindigkeit der Fluoresbrite desselben Versuchs,  $p < 0,001$ . Angaben als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. Durchführung des Wilcoxon-Tests.

## 3.2 Translokation des NF $\kappa$ B p65 in den Zellkern

Der Transport von Partikeln und Bakterien verschiedener Größe konnte im ex-vivo Modell gezeigt werden. Ob durch Inkubation mit Bakterien und LPS eine zelluläre Stimulation erfolgt, wurde durch die Translokation von NF $\kappa$ B p65 in den Zellkern nachgewiesen.

### 3.2.1 Inkubation mit *H. influenzae*

Bei der Inkubation explantierter Tracheen mit *H. influenzae* konnte die Translokation von NF $\kappa$ B p65 in den Zellkern nachgewiesen werden (s. Abb. 3.15, nächste Seite).

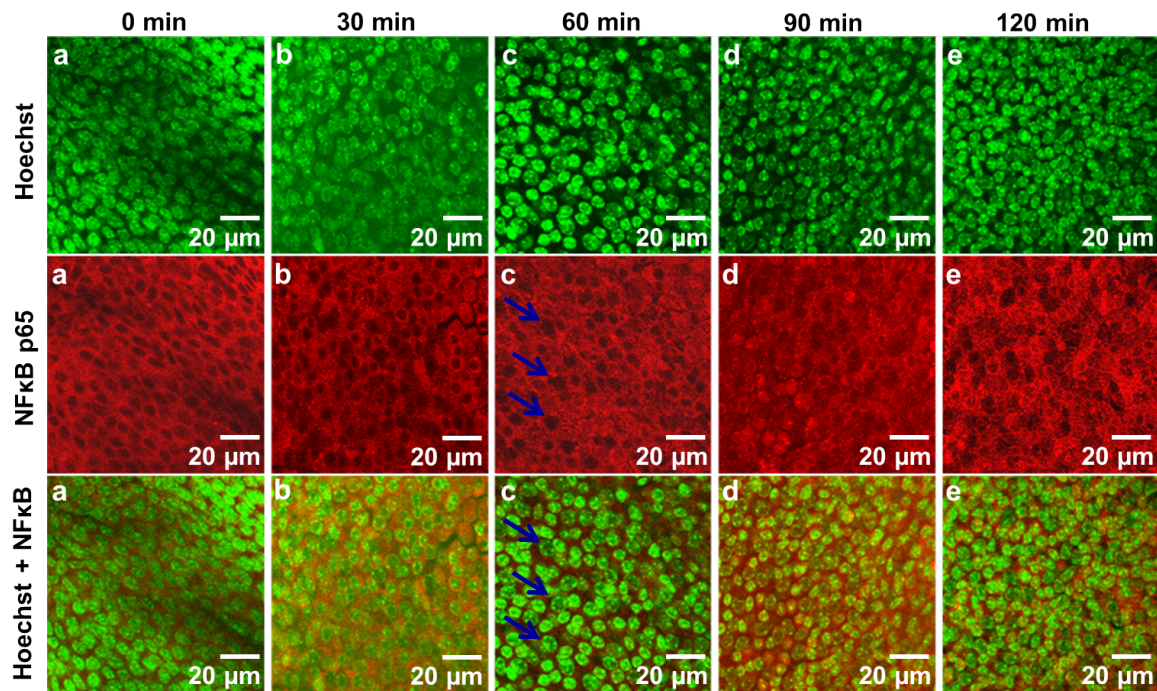


Abbildung 3.15: Stimulation einer ex-vivo Trachea mit *H. influenzae* für 0 (a), 30 (b), 60 (c), 90 (d) und 120 min (e). Die obere Reihe stellt die mit Hoechst markierten Zellkerne dar, die zweite Reihe in rot NF $\kappa$ B p65 im Zytosol und im Zellkern. Die dritte Reihe zeigt die Kombination aus beiden Farbsignalen. Die blauen Pfeile zeigen beispielhaft auf Zellkerne, in denen es nicht zu einer Translokation von NF $\kappa$ B p65 in den Zellkern gekommen ist. Nachweis in n = 5 Tieren.

Bei 0 min Inkubation waren durchschnittlich in 4,62 % ( $\pm 0,89$ %) der Zellkerne die Translokation von NF $\kappa$ B p65 nachzuweisen, die sich auf 8,16 % ( $\pm 0,50$ %) nach 30 min steigerte (s. Abb. 3.16).

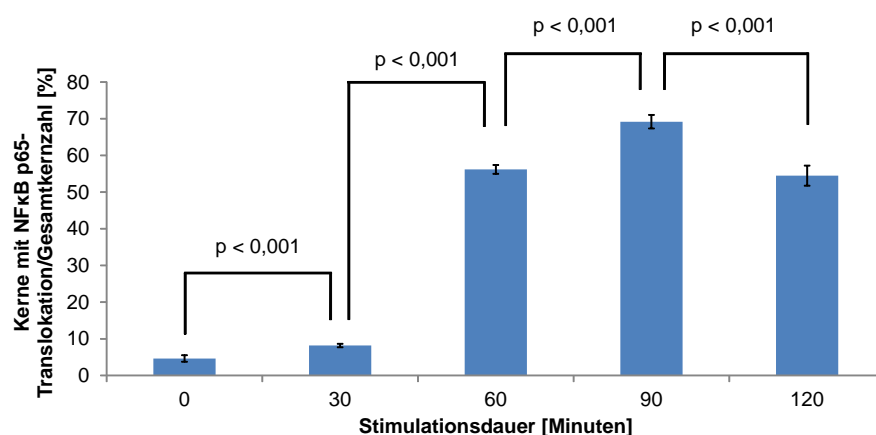


Abbildung 3.16: Verhältnis von Kernen mit NF $\kappa$ B p65-Translokation in den Zellkern zur Gesamtzahl an Zellkernen. Verlaufsbeobachtung von 0 bis 120 min bei Stimulation mit *H. influenzae*. Nachweis in n = 5 Tieren. Angaben als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. Durchführung des Wilcoxon-Tests.

Nach 60 min ergab sich eine ca. 7-fache Steigerung auf durchschnittlich 56,18 % ( $\pm 1,20$  %), um nach 90 min auf durchschnittlich 72,26 % ( $\pm 1,86$  %) weiter anzusteigen. Nach 120 min Stimulation mit *H. influenzae* sank die durchschnittliche Zahl der Zellkerne mit transloziertem NF $\kappa$ B p65 wieder auf 54,47 % ( $\pm 3,04$  %). Nach 90 min Inkubation wurde also das Maximum erreicht, der größte Zugewinn an Translokationen fand zwischen 30 und 60 min statt. Das ermittelte Verhältnis von Kernen mit Translokation von NF $\kappa$ B p65 in den Zellkern zur Gesamtzahl an Zellkernen unterschied sich signifikant zum Verhältnis der vorherigen, 30 min kürzeren Inkubationszeit (s. Abb. 3.16,  $p < 0,001$ ).

Die Translokation konnte trotz ubiquitär vorhandenem Stimulans nicht in allen Zellkernen nachgewiesen werden. Aufgrund eines immer ähnlichen Verteilungsmusters wurde mithilfe von Durchlicht untersucht, in welchen Zellen die Translokationen vorlagen. Es zeigte sich hierbei, dass die Translokation von NF $\kappa$ B p65 in den Zellkern nur in den nicht-zilientragenden Zellen stattfand, die zilientragenden Zellen blieben dagegen bei den Translokationen ausgespart (s. Abb. 3.17).

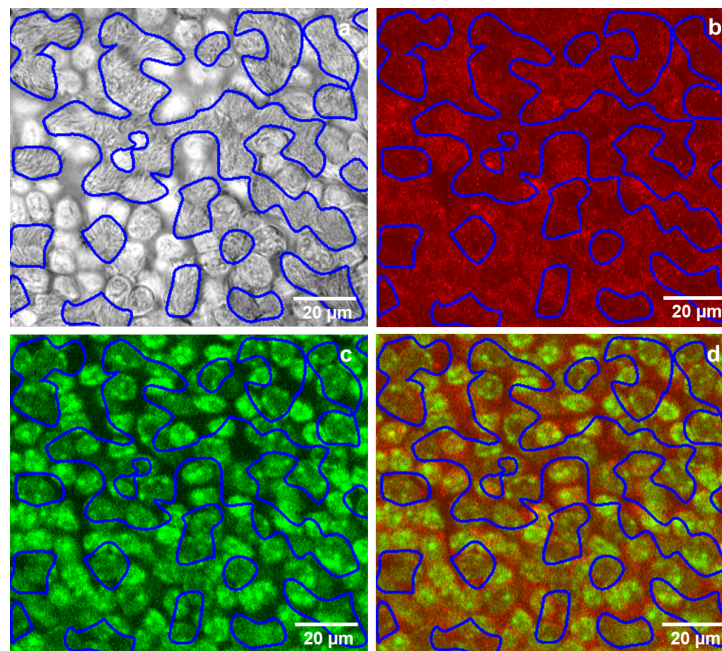


Abbildung 3.17: Translokation von NF $\kappa$ B p65 in den Zellkern nach Stimulation mit *H. influenzae* in nicht-zilientragenden Zellen. Bild (a) auf Höhe des Epithels stellt mithilfe von Durchlicht die zilien- und nicht-zilientragenden Zellen dar. Zellen, die sicher als zilientragend identifizierbar waren, sind blau umrandet. Bild (b) zeigt die immunohistochemische Darstellung von NF $\kappa$ B p65 im Zytosol und im Zellkern (rot). Schwarze Aussparungen entsprechen einer nicht stattgefundenen NF $\kappa$ B p65-Translokation in den Zellkern. Bild (c) stellt die grün angefärbten Zellkerne mit einem DNA-Farbstoff dar. Bild (d) zeigt die Kombination aus beiden Farbsignalen in (b) und (c). Da in den blau umrandeten Zellen keine Rotfärbung des Kerns vorliegt, ist dort somit keine Translokation von NF $\kappa$ B p65 im Zellkern nachweisbar. Nachweis in  $n = 5$  Tieren.

### 3.2.2 Inkubation mit LPS

Auch durch Stimulation mit LPS konnte eine Translokation von NF $\kappa$ B p65 in den Zellkern einiger Epithelzellen nachgewiesen werden (s. Abb. 3.18).

Bei Erfassung des zeitlichen Verlaufs der NF $\kappa$ B p65-Translokationen in den Zellkern während der Stimulation mit LPS zeigte sich, dass zum Zeitpunkt 0 min durchschnittlich in 1,80 % ( $\pm 0,56$  %) der Zellen das translozierte NF $\kappa$ B p65 im Zellkern nachgewiesen werden konnte (s. Abb. 3.19, nächste Seite). Nach 15 min Stimulation nahm die Anzahl der NF $\kappa$ B p65-positiven Zellkerne zu ( $23,52$  %  $\pm 1,56$  %), erreichte nach 30 min ihren Maximalwert ( $64,05$  %  $\pm 1,65$  %), um nach 45 min Stimulation wieder abzusinken ( $45,13$  %  $\pm 1,31$  %). Nach 60 min war nur noch ein sehr geringer Nachweis möglich ( $9,74$  %  $\pm 0,95$  %). Zwischen 15 und 30 min fand also die größte Zunahme an Translokationen von NF $\kappa$ B p65 in den Zellkern statt (s. Abb. 3.19, nächste Seite). Das ermittelte Verhältnis von Kernen mit NF $\kappa$ B p65-Translokation in den Zellkern zur Gesamtzahl an Zellkernen unterschied sich auch hier signifikant zum Verhältnis der 15 min kürzeren Inkubationszeit ( $p < 0,001$ ).

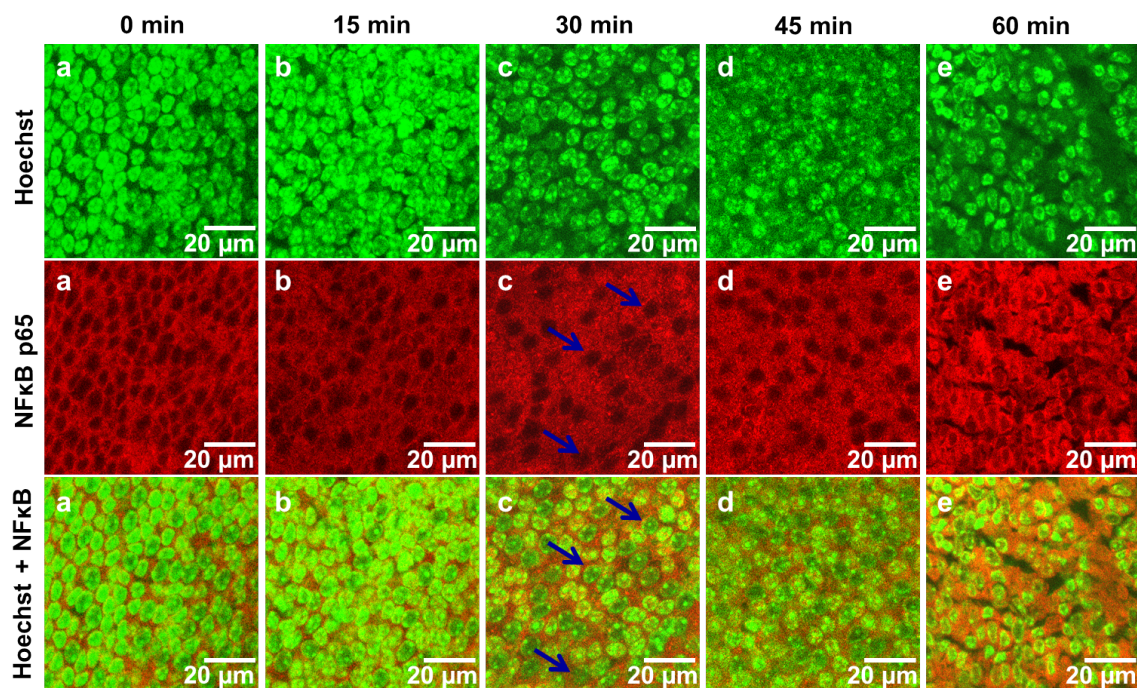


Abbildung 3.18: Stimulation einer ex-vivo Trachea mit LPS für 0 (a), 15 (b), 30 (c), 45 (d) und 60 min (e). Die obere Reihe stellt die mit Hoechst markierten Zellkerne dar, die zweite Reihe in rot NF $\kappa$ B p65 im Zytosol und im Zellkern. Die dritte Reihe zeigt die Kombination aus beiden Farbsignalen. Die blauen Pfeile zeigen beispielhaft auf Zellkerne, in denen es nicht zu einer Translokation von NF $\kappa$ B p65 in den Zellkern gekommen ist. Nachweis in  $n = 5$  Tieren.

Wie auch bei der Stimulation mit *H. influenzae* beobachtet, fiel ein bestimmtes Verteilungsmuster der NF $\kappa$ B p65-Translokationen bei Stimulation mit LPS auf. Bei Nutzung von Durch-

licht zeigte sich auch hierbei, dass die beobachteten Translokationen von NF $\kappa$ B p65 in den nicht-zilientragenden Zellen stattfand und die zilientragenden Zellen aussparte (s. Abb. 3.20).

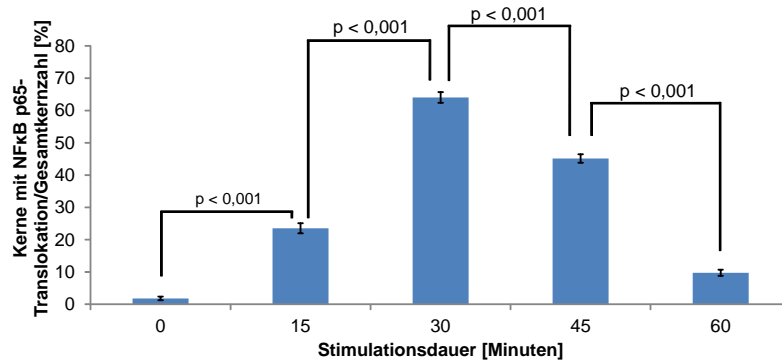


Abbildung 3.19: Verhältnis von Kernen mit NF $\kappa$ B p65-Translokation in den Zellkern zur Gesamtzahl an Zellkernen. Verlaufsbeobachtung von 0 bis 60 min bei Stimulation mit LPS. Nachweis in n=5 Tieren. Angaben als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. Durchführung des Wilcoxon-Tests.

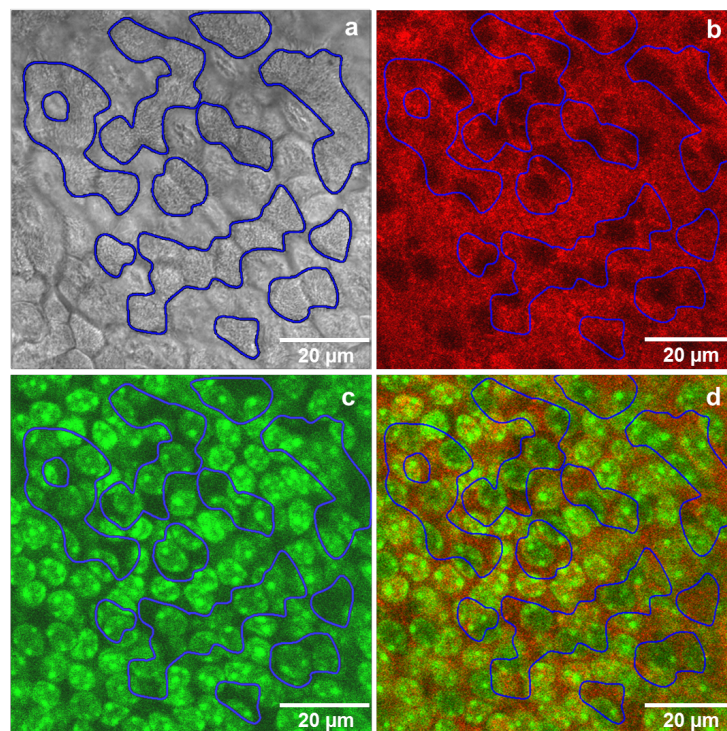


Abbildung 3.20: Translokation von NF $\kappa$ B p65 in den Zellkern nach Stimulation mit LPS in nicht-zilientragenden Zellen. Bild (a) auf Höhe des Epithels stellt die zilien- und nicht-zilientragenden Zellen dar. Zellen, die sicher als zilientragend identifizierbar waren, sind blau umrandet. Bild (b) zeigt die immunhistochemische Darstellung von NF $\kappa$ B p65 im Zytosol und im Zellkern (rot). Schwarze Aussparungen entsprechen einer nicht stattgefundenen NF $\kappa$ B p65-Translokation in den Zellkern. Bild (c) stellt die Kombination aus beiden Farbsignalen dar. Da in den blau umrandeten Zellen keine Rotfärbung des Kerns vorliegt, ist dort somit keine Translokation von NF $\kappa$ B p65 im Zellkern nachweisbar. Nachweis in n=5 Tieren.

### 3.3 Evaluierung des neuen Verfahrens zur Epithelzellgewinnung

Die ersten Versuche zur Epithelgewinnung zeigten, dass gewöhnliche Polyestertupfer (s. Kap. 2.7, s. Abb. 3.21c) die Epithelzellen zwar abstrichen (s. Abb. 3.21a und b), diese danach aber nicht wieder abgelöst werden konnten. Demgegenüber konnten abgestrichene Zellen von einer Ausstrichöse (s. Abb. 3.21f) zwar sehr gut wieder abgelöst werden, die Gesamtaufnahme fiel jedoch sehr gering aus (s. Abb. 3.21d und e). Als sehr gute Möglichkeit stellte sich nach einigen Versuchen (s. Kap. 2.7) die Verwendung des Copan-Tupfers dar (s. Abb. 3.21i), der die Vorteile des Tupfers mit denen der Öse vereinte. Mit dieser Technik konnten durchschnittlich 1,54 µg RNA aus einer Trachea gewonnen werden. Im Gegensatz dazu konnten mit den regulären Polyestertupfern nur durchschnittlich 7,53 ng RNA pro Trachea gewonnen werden. Die Kontrolle der Epithelabnahme durch das Anfertigen von REM-Bildern bewies, dass nur das Epithel abgenommen wurde, nicht aber die subepithelialen Zellen (s. Abb. 3.21g und h).

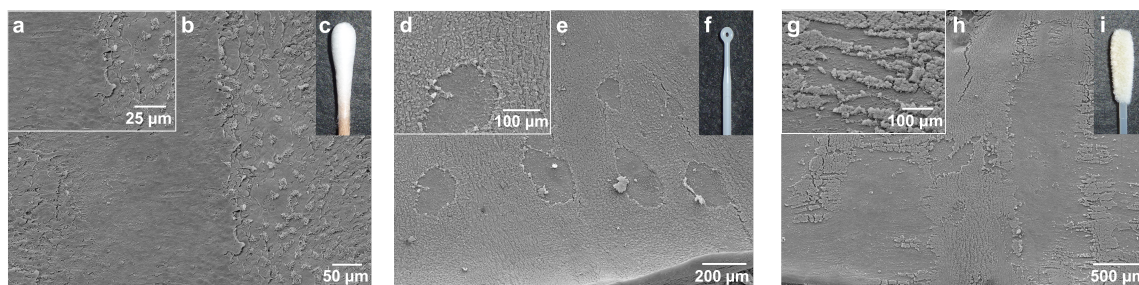


Abbildung 3.21: REM-Bild: Blick auf eine murine Trachea nach Abstrich (b) mit einem Polyestertupfer (c), (e) mit einer Kunststofföse (f) und (h) mit einem Copan-Tupfer (i). Nach Abstrich mit der Kunststofföse sind kleine Bereiche ohne Epithel zu erkennen. Der Copan-Tupfer, genauso wie der Polyestertupfer, erzeugte große, epithelfreie Bereiche. (a), (d) und (g) zeigen die entsprechenden Nahaufnahmen nach dem Abstrich.

### 3.4 Nachweis der Regulation von Cytokin- und Chemokin-mRNA

Nachdem die Translokation von NF $\kappa$ B p65 nach der Inkubation mit LPS und *H. influenzae* nachgewiesen werden konnte, wurde überprüft, ob diese Stimulationen zu einer mRNA-Induktion von Entzündungsmediatoren führt. Dazu erfolgten Inkubationen mit LPS, *H. influenzae*, *S. aureus* und Pam3Cys mit oder ohne MyD88-Inhibitor.

#### 3.4.1 Stimulation mit LPS

LPS führte in murinem Trachealepithel nach 2,5 h Inkubation bei 37 °C zu einer Hochregulation von IL6-, MIP-2-, KC- und CXCL5-mRNA (alle  $p < 0,001$ , bis auf CXCL5  $p < 0,005$ ; s. Abb. 3.22, nächste Seite). Im Vergleich zur Negativkontrolle (Wert immer 1) war der MIP-2-mRNA-Wert mit 88,75 ( $\pm 3,04$ ) am stärksten erhöht. Der IL6-mRNA-Wert stieg auf 46,82

( $\pm 2,61$ ), KC- und CXCL5-mRNA erhöhten sich auf 39,32 ( $\pm 1,92$ ) bzw. 13,61 ( $\pm 1,25$ ). Nach Ablauf der Inkubationszeit konnte keine signifikante Steigerung der Menge an MCP-1-mRNA gemessen werden ( $p > 0,1$ ).

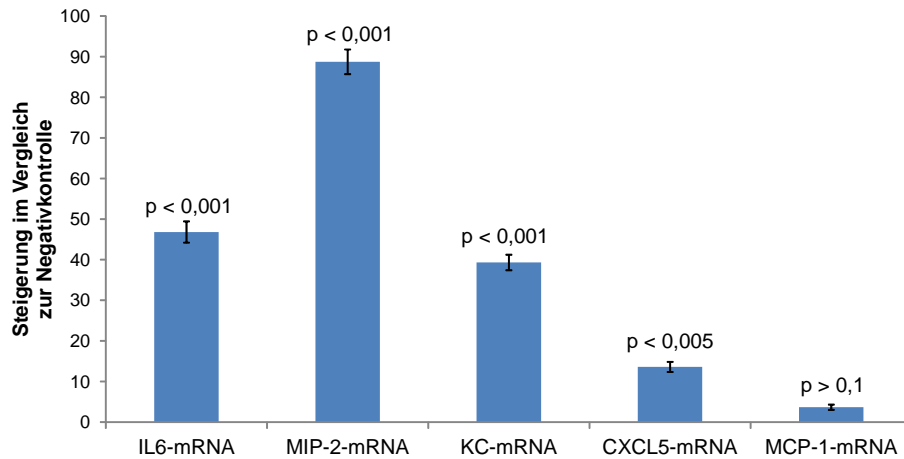


Abbildung 3.22: 2,5 h Inkubation mit 1  $\mu\text{g/ml}$  LPS. Durchschnittliche Zunahme der IL6-, MIP-2-, KC-, CXCL5- und MCP-1-mRNA-Menge im Vergleich zur unstimulierten Probe. Nachweis in  $n = 10$  Tieren. Angaben als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. Durchführung des Wilcoxon-Tests.

### 3.4.2 Stimulation mit *H. influenzae*

Als Vertreter der gram-negativen Stäbchen wurde die Stimulation des murinen Trachealepithels mit *H. influenzae* 2019 durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass sich durch 2,5 h Inkubation bei 37 °C die Menge der gebildeten IL6-, MIP-2-, KC- und MCP-1-mRNA im Vergleich zur Negativkontrolle signifikant erhöhte (alle  $p < 0,001$ ; MCP-1  $p < 0,05$ ; s. Abb. 3.23).

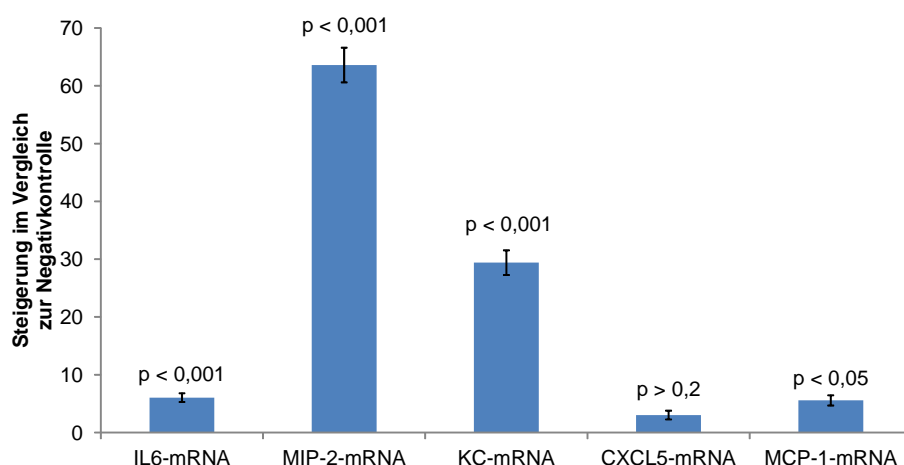


Abbildung 3.23: 2,5 h Inkubation mit  $3,5 \cdot 10^8$  *H. influenzae* pro Tracheahälfte. Durchschnittliche Zunahme der IL6-, MIP-2-, KC-, CXCL5- und MCP-1-mRNA-Menge im Vergleich zur unstimulierten Probe. Nachweis in  $n = 7$  Tieren. Angaben als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. Durchführung des Wilcoxon-Tests.

Der größte Anstieg konnte bei MIP-2-mRNA mit einer durchschnittlichen Steigerung auf 63,59 ( $\pm 3,00$ ) beobachtet werden. KC-mRNA stieg auf 29,39 ( $\pm 2,13$ ). IL6- und MCP-1-mRNA erhöhten sich auf 6,03 ( $\pm 0,75$ ) bzw. 5,56 ( $\pm 0,88$ ). Die Menge an CXCL5-mRNA erreichte nicht das Signifikanzniveau.

### 3.4.3 Stimulation mit *S. aureus*

Die Stimulation mit einem gram-positiven Keim erfolgte mit *S. aureus*. Es zeigte sich, dass alle gemessenen Parameter (IL6-, MIP-2-, KC-, CXCL5- und MCP-1-mRNA) unterhalb des Signifikanzniveaus lagen (s. Abb. 3.24).

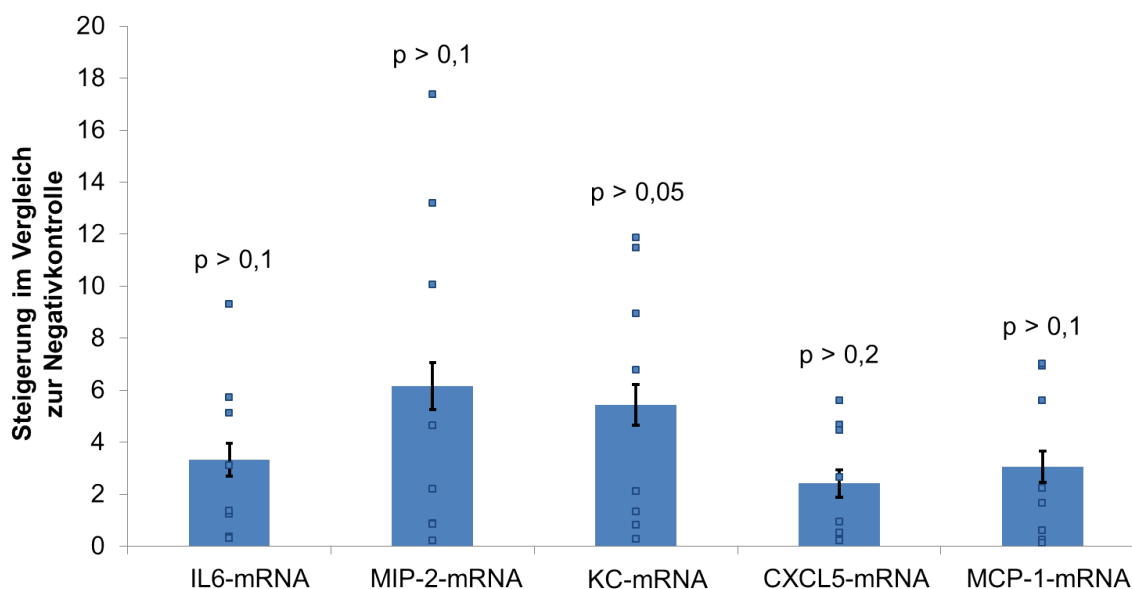


Abbildung 3.24: 2,5h Inkubation mit  $1,4 \cdot 10^9$  *S. aureus* pro Tracheahälfte. Durchschnittliche Werte (Balkendiagramm) und einzelne Werte (kleine Vierecke) der Steigerung der IL6-, MIP-2-, KC-, CXCL5- und MCP-1-mRNA-Menge im Vergleich zur unstimulierten Probe. Nachweis in  $n = 8$  Tieren. Angaben als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. Durchführung des Wilcoxon-Tests.

### 3.4.4 Stimulation mit Toll-like-Rezeptor-2-Agonist Pam3Cys

Da die Stimulation mit *S. aureus* nicht zu den erwarteten Ergebnissen führte, wurde der Stimulationsversuch mit dem TLR2-Agonisten Pam3Cys vorgenommen. Somit konnte die Rezeptorausstattung des murinen Trachealepithels untersucht werden. Dabei erfolgte die Stimulation mit Pam3Cys in zwei verschiedenen Konzentrationen, mit 100 ng/ml (s. Abb. 3.25a, nächste Seite) und 10  $\mu$ g/ml (s. Abb. 3.25b). Es zeigte sich, dass die intrazelluläre mRNA-Produktion von IL6 nur durch die hundertfach höhere Konzentration (10  $\mu$ g/ml) von Pam3Cys hochreguliert werden konnte (p > 0,2 vs. p < 0,05). Die Steigerung von IL6-mRNA

im Vergleich zur Negativkontrolle erfolgte bei Verwendung der höheren Konzentration durchschnittlich auf 4,86 ( $\pm 0,96$ ). Nach Stimulation mit 10  $\mu$ g/ml Pam3Cys stiegen auch die Mengen an MIP-2 und KC-mRNA auf 5,97 ( $\pm 0,87$ ) bzw. 6,16 ( $\pm 0,74$ ) ( $p < 0,001$ ). Der CXCL5- und der MCP-1-mRNA-Level erreichten ebenfalls nicht das Signifikanzniveau ( $p > 0,1$  bzw.  $p > 0,05$ ). Im Vergleich der Stimulationsstärke von LPS mit Pam3Cys fiel auf, dass die Antwort auf LPS-Stimulation außer für IL6-mRNA immer signifikant höher ausfiel als die auf Pam3Cys (IL6-mRNA  $p > 0,05$ ; MIP-2- und KC-mRNA  $p < 0,001$ ; CXCL5-mRNA  $p < 0,05$ ).

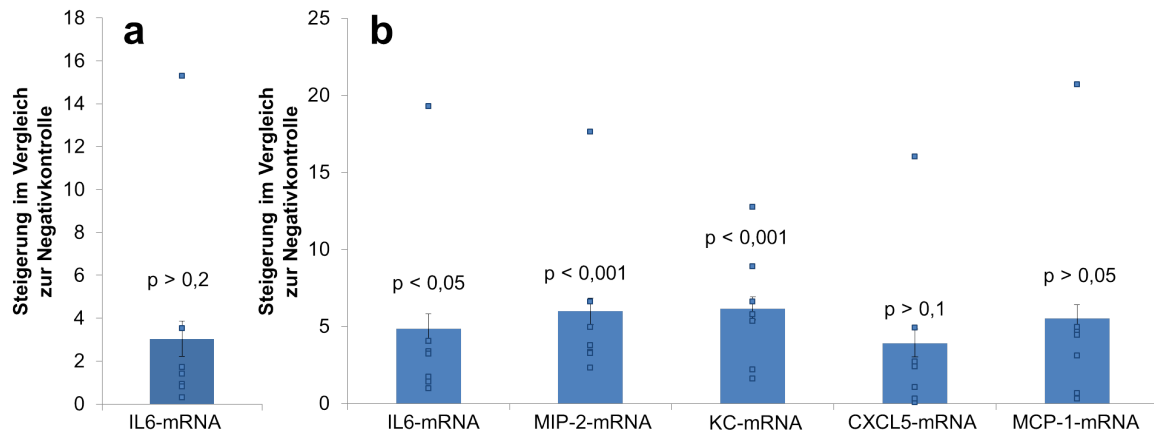


Abbildung 3.25: 2,5 h Inkubation mit Pam3Cys. (a) 100 ng/ml Pam3Cys: Durchschnittliche (Balkendiagramm) und einzelne Werte (kleine Vierecke) der Steigerung der IL6-mRNA-Menge im Vergleich zur unstimulierten Probe. Nachweis in  $n = 8$  Tieren. Angaben als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. Durchführung des Wilcoxon-Tests. (b) 10  $\mu$ g/ml Pam3Cys: Durchschnittliche Werte (Balkendiagramm) und einzelne Werte (kleine Vierecke) der Steigerung der IL6-, MIP-2-, KC-, CXCL5- und MCP-1-mRNA-Menge im Vergleich zur unstimulierten Probe. Nachweis in  $n = 6$  Tieren. Angaben als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. Durchführung des Wilcoxon-Tests.

### 3.5 MyD88-Inhibitor: Wirkung auf NF $\kappa$ B-Translokation und Cytokin-/Chemokin-mRNA

Da nach LPS-Stimulation die Translokation von NF $\kappa$ B p65 in den Zellkern und der Anstieg von Cytokin- und Chemokin-mRNA nachgewiesen werden konnten, sollte geprüft werden, ob dies TLR- und somit MyD88-vermittelt geschieht. Dazu wurde die Homodimerisation von MyD88 gehemmt. Untersucht wurden dabei Veränderungen der nukleären Translokationen von NF $\kappa$ B p65 und Veränderungen auf mRNA-Ebene.

#### 3.5.1 Translokation von NF $\kappa$ B p65 in den Zellkern

Nach 4 h Vorinkubation mit dem MyD88-Inhibitor schloss sich die 30 min dauernde LPS-Stimulation an und zeigte, dass nach 4 h MyD88-Inhibition die Translokation von NF $\kappa$ B in den Zellkern durch LPS kaum noch induzierbar war (s. Abb. 3.26, nächste Seite).

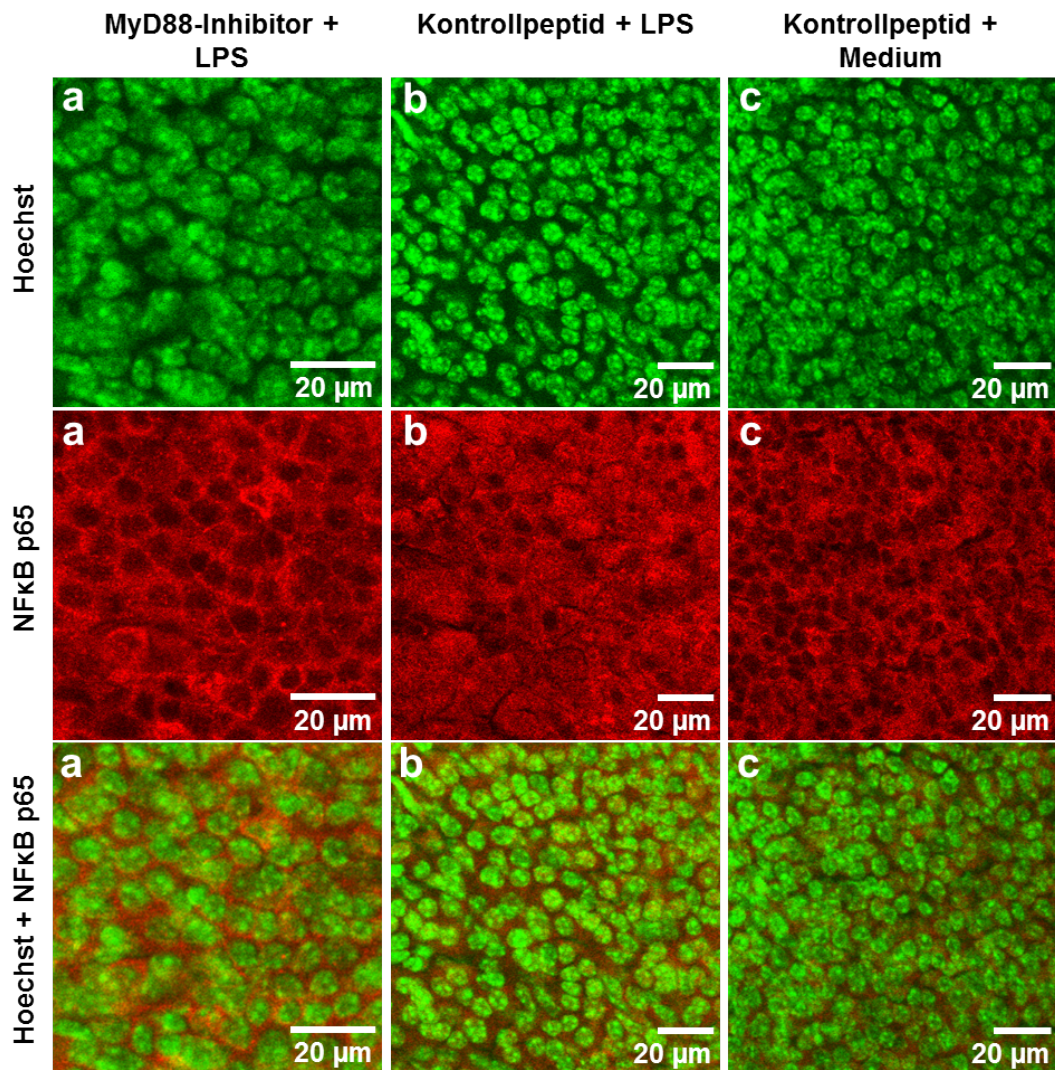


Abbildung 3.26: Hemmung der Translokation von NF $\kappa$ B p65 in den Zellkern durch 4 h Vorinkubation mit dem MyD88-Inhibitor (100  $\mu$ M). Die obere Reihe stellt die mit Hoechst markierten Zellkerne dar, die zweite Reihe in rot NF $\kappa$ B p65 im Zytosol und im Zellkern. Schwarze Aussparungen entsprechen einer nicht stattgefundenen NF $\kappa$ B p65-Translokation in den Zellkern. Die dritte Reihe zeigt die Kombination aus beiden Farbsignalen. Nachweis in n = 5 Tieren, Negativkontrolle (Kontrollpeptid, Hepes-gepufferte Ringerlösung) in n = 3 Tieren.

(a) 4 h Vorinkubation mit 100  $\mu$ M MyD88-Inhibitor, anschließend 30 min Inkubation mit LPS;

(b) 4 h Vorinkubation mit 100  $\mu$ M Kontrollpeptid, anschließend 30 min Inkubation mit LPS;

(c) 4 h Vorinkubation mit Kontrollpeptid, anschließend 30 min Inkubation in Hepes-gepuffertes Ringerlösung.

Die Positivkontrolle (4 h Inkubation mit einem Kontrollpeptid und anschließend 30 min LPS-Stimulation) zeigte im Gegensatz dazu eine sehr starke Translokation von NF $\kappa$ B p65 ( $p < 0,001$ ; s. Abb. 3.27, nächste Seite). Um auszuschließen, dass alleine die vierstündige Inkubation im Medium ausreicht, diese Reaktion auszulösen, wurde eine Negativkontrolle (4 h Inkubation mit einem Kontrollpeptid, danach 30 min Inkubation in Hepes-gepuffertes Ringerlösung) herangezogen. Es zeigte sich, dass während 4 h im Medium keine mit der Positivkontrolle vergleichbare Translokation von NF $\kappa$ B p65 in den Zellkern stattfand.

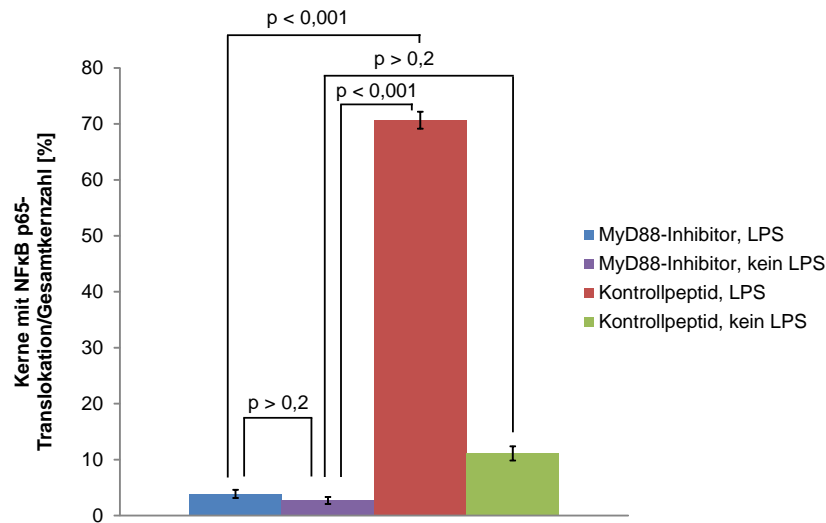


Abbildung 3.27: Verhältnis von Kernen mit NF $\kappa$ Bp65-Translokation in den Zellkern zur Gesamtzahl an Zellkernen. Nachweis in n = 5 Tieren, Negativkontrolle (Kontrollpeptid, Hepes-gepufferte Ringerlösung) in n = 3 Tieren. Angaben als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. Durchführung des Wilcoxon-Tests.

### 3.5.2 Nachweis der Regulation von Cytokin- und Chemokin-mRNA

Durch die 4 h Vorinkubation mit dem MyD88-Inhibitor und anschließend 2,5 h Inkubation mit LPS konnte die Hochregulation von IL6-, MIP-2, KC-, CXCL5- und MCP-1-mRNA im Vergleich zur ungehemmten, LPS-stimulierten Probe (Positivkontrolle) signifikant reduziert werden ( $p < 0,001$ ; s. Abb. 3.28, nächste Seite). Die stärksten Hemmungen im Vergleich zur Positivkontrolle (Wert immer 1) konnten bei der Menge an MIP-2-mRNA mit 0,21 ( $\pm 0,16$ ), MCP-1-mRNA mit 0,22 ( $\pm 0,22$ ) und CXCL5-mRNA mit 0,24 ( $\pm 0,16$ ) beobachtet werden. KC- und IL6-mRNA wurden auf 0,28 ( $\pm 0,18$ ) bzw. 0,33 ( $\pm 0,24$ ) reduziert.

Die Positivkontrolle (Kontrollpeptid, LPS) war im Vergleich zur Negativkontrolle (Kontrollpeptid, kein LPS) signifikant erhöht ( $p < 0,001$ ; s. Abb. 3.28): für MIP-2-mRNA auf 8,95 ( $\pm 1,28$ ), für CXCL5-mRNA auf 4,93 ( $\pm 0,77$ ), für KC-mRNA auf 2,98 ( $\pm 0,36$ ) sowie für IL6-mRNA auf 1,89 ( $\pm 0,49$ ). Im Gegensatz dazu erreichte die Menge an MCP-1-mRNA wie schon in den vorherigen Versuchen (s. Kap. 3.4.1) nicht das Signifikanzniveau ( $p > 0,2$ ).

Beide Proben mit MyD88-Inhibitor (s. Tab. 2.1, S. 22) waren in der Mehrheit der Parameter nicht signifikant unterschiedlich zur Negativkontrolle ( $p > 0,2$ ). Lediglich die Menge an MCP-1-mRNA war in der gehemmten, LPS-stimulierten Probe im Vergleich zur Negativkontrolle mit durchschnittlich 0,34 ( $\pm 0,18$ ) signifikant geringer ( $p < 0,001$ ). Die gehemmte, nicht LPS-stimulierte Probe im Vergleich zur Negativkontrolle fiel in der Menge an MIP-2-mRNA mit durchschnittlich 0,35 ( $\pm 0,21$ ) signifikant geringer aus (s. Abb. 3.28, nächste Seite).

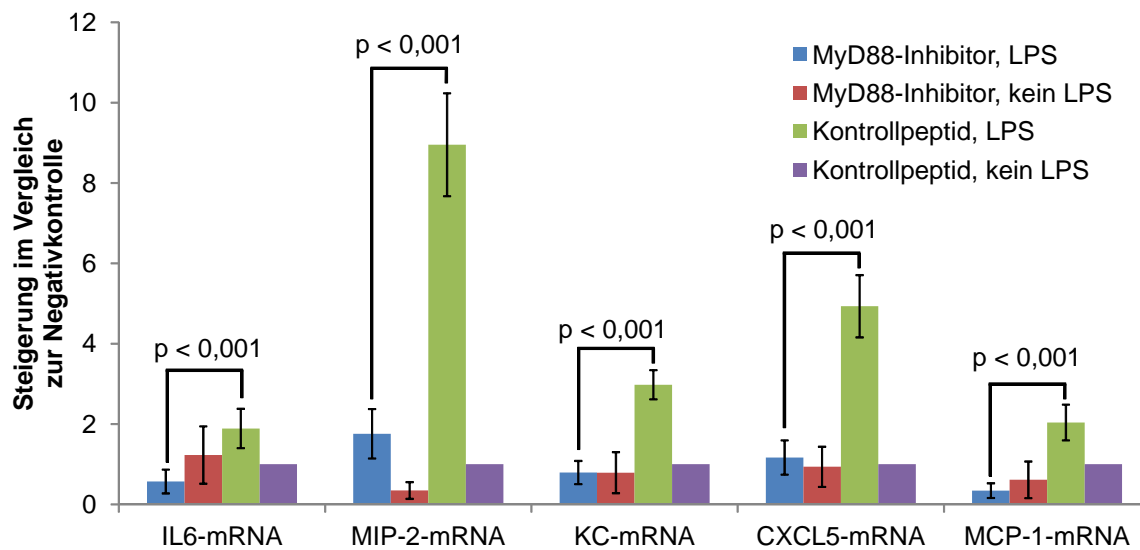


Abbildung 3.28: Veränderung der mRNA-Menge an Cytokinen und Chemokinen nach 4 h Vorinkubation mit dem MyD88-Inhibitor bzw. Kontrollpeptid und anschließender Stimulation mit LPS für 2,5 h. Durchschnittliche Zunahme der IL6-, MIP-2-, KC-, CXCL5- und MCP-1-mRNA-Menge im Vergleich zur unstimulierten Probe (Kontrollpeptid, Hepes-gepufferte Ringerlösung). Nachweis in  $n=4$  Tieren. Angaben als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. Durchführung des Wilcoxon-Tests.

## 3.6 Zellfunktionen in Abhängigkeit von der Temperatur

Um zu untersuchen, welchen Effekt physiologische Veränderungen der Temperatur auf das Atemwegsepithel haben, wurden sowohl mechanische Veränderungen als auch Veränderungen auf mRNA-Ebene bei Erhöhen oder Senken der Temperatur untersucht. Die Zilienschlagfrequenz sowie die Menge an Cytokin- und Chemokin-mRNA bildeten dabei die entscheidenden Kriterien.

### 3.6.1 Temperaturabhängigkeit der Zilienschlagfrequenz

Die Zilienschlagfrequenz der Trachea variierte mit Erhöhen oder Senken der Temperatur ihres Mediums. Innerhalb des untersuchten Temperaturintervalls besaß jede Trachea zwei Frequenzminima (s. Abb. 3.29, nächste Seite). Eines lag bei 24,2 °C, wo die Zilienschlagfrequenz durchschnittlich 7,14 Hz betrug. Das zweite Minimum war bestimmt durch Erreichen des für jede Trachea unterschiedlichen Temperaturmaximums und lag zwischen 42,2 °C bis 44,2 °C. Hierbei war in fünf Fällen keine Zilienschlagfrequenz mehr nachweisbar. Lediglich eine untersuchte Trachea besaß bei einer Temperatur von 44,2 °C noch eine Restaktivität der Zilien: Die verbliebenen aktiven Zellen schlugen durchschnittlich noch mit 1,98 Hz. Die Versuche dauerten aufgrund des unterschiedlichen Aufwärmverhaltens der Objektschälchen zwischen 34 und 67 min. Zwischen Versuchsdauer und Hitzetoleranz konnte kein Zu-

sammenhang erkannt werden. Weder besonders lange, vermeintlich schonendere, noch besonders kurze Aufwärmzeiten ließen einen eindeutigen Rückschluss auf das schlechtere Verhalten höherer Temperaturen und damit auf das frühere Sistieren des Zilienschlags zu.

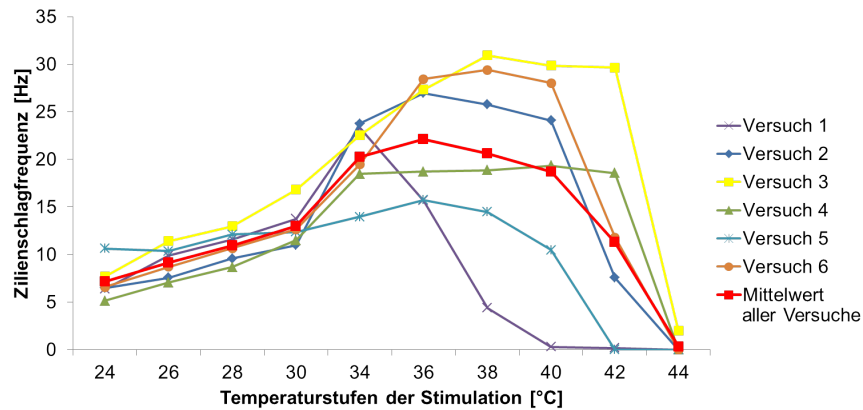


Abbildung 3.29: Veränderung der Zilienschlagfrequenz über verschiedene Temperaturstufen. Dargestellt sind sowohl die Mittelwerte der Einzeltiere als auch der Mittelwert aller Versuchstiere. Nachweis in  $n = 60$  Zellen aus 6 Tieren. Bei Bezug der Minimalfrequenz einer Zelle auf die Maximalfrequenz der gleichen Zelle bei verschiedenen Temperaturen,  $p < 0,001$ . Bei Bezug der Minimalfrequenz einer Zelle auf die Maximalfrequenz einer anderen Zelle des gleichen Areals bei gleicher Temperatur,  $p < 0,001$ .

Außerdem konnte beobachtet werden, dass nicht alle Zellen ein einheitliches Temperaturoptimum hatten. Dieses variierte sowohl von Trachea zu Trachea als auch innerhalb einer einzelnen Trachea von Zelle zu Zelle (s. Abb. 3.30).

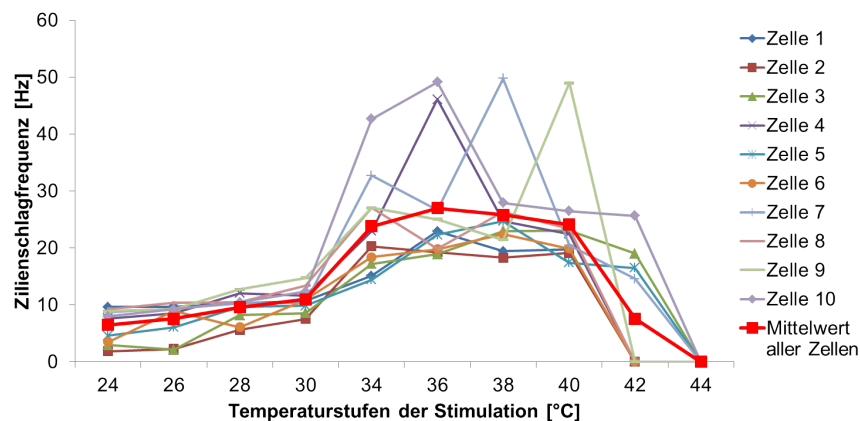


Abbildung 3.30: Die einzelnen zilientragenden Zellen des untersuchten Tracheaareals erreichen ihre maximale Zilienschlagfrequenz jeweils bei unterschiedlichen Temperaturen. Dargestellt sind die Veränderungen der Zilienschlagfrequenz über verschiedene Temperaturstufen. Es sind sowohl die Werte der Einzelzellen als auch der Mittelwert aller Zellen angegeben.

So lagen die Temperaturoptima bei den gewählten Zellen bei  $34,2\text{ °C}$ ,  $36,2\text{ °C}$ ,  $38,2\text{ °C}$  bzw.  $40,2\text{ °C}$ . Beispielhaft dafür sind in Abbildung 3.30 die Zilienschlagfrequenzen der Einzelzellen angegeben, die die unterschiedlichen Temperaturoptima der einzelnen zilientragenden

Zellen verdeutlichen. Auch hierbei ließ sich keine Verbindung zwischen der Versuchsdauer und den unterschiedlichen Optima feststellen.

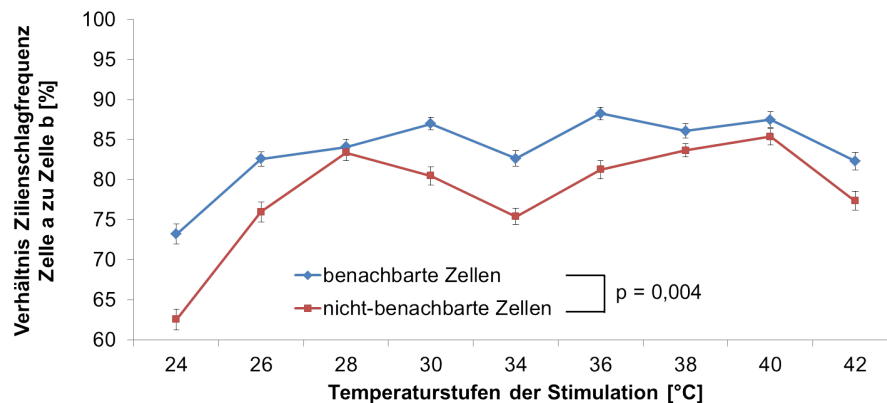


Abbildung 3.31: Prozentuale Übereinstimmung der Zilienschlagfrequenz zwischen benachbarten bzw. nicht benachbarten zilientragenden Zellen. Die jeweils höhere Frequenz wurde 100 % gleichgesetzt, die niedrigere entsprechend anteilig berechnet. Veränderung der prozentualen Übereinstimmung über verschiedene Temperaturstufen. Nachweis in  $n=5$  Tieren.  $p=0,004$ . Angaben als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. Durchführung des Wilcoxon-Tests.

Es zeigte sich, dass sich die Frequenz innerhalb der zehn zufällig ausgesuchten Zellen signifikant unterschied ( $p < 0,001$ ). Es gab dabei sowohl sehr langsam, als auch sehr schnell schlagende Zellen und einige, die im Mittelbereich lagen. Da es naheläge, dass benachbarte Zellen in etwa mit der gleichen bzw. einer sehr ähnlichen Frequenz schlagen, wurden diese Frequenzen hinsichtlich dieser Fragestellung untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass der Großteil der benachbarten Zellen eine ähnliche Frequenz hatte. Bei Gleichsetzen der höheren Zilienschlagfrequenz der untersuchten Nachbarzellen mit 100 % zeigte sich, dass in der gleichen Temperaturstufe die langsameren Zellen durchschnittlich 84,03 % der Zilienschlagfrequenz der schnelleren Zellen erreichten (s. Abb. 3.31). Damit unterschied sich dieses Verhältnis signifikant von zufällig, stichprobenartig ausgewählten nicht benachbarten Zellen ( $p=0,004$ ), bei denen die niedrigeren Zilienschlagfrequenzen durchschnittlich 74,71 % der höheren Frequenzen erreichten. Am stärksten variierten die Zilienschlagfrequenzen in Bereichen hoher und niedriger Temperaturen. So lagen die langsameren benachbarten Zellen bei 24,2 °C nur noch bei 77,47 % bzw. bei 42,2 °C bei 75,66 % der Frequenz der schnelleren Zellen. Die Variabilität der nicht benachbarten Zellen war bei 24,2 °C noch größer, die langsameren Zellen erreichten nur noch 58,71 % der Frequenz der schnelleren Zellen. Die maximale Übereinstimmung der Zilienschlagfrequenz benachbarter Zellen fand sich im Bereich des durchschnittlichen Temperaturoptimums: Bei 36,2 °C erreichten die langsameren Zellen 89,70 % der Frequenz der schnelleren Zellen (s. Abb. 3.31).

Die Veränderung der Zilienschlagfrequenz bei Erhöhung der Temperatur um 2 °C führte bis 36,2 °C durchschnittlich zu einer Steigerung um 34,13 % (2 °C niedrigere Temperaturstufe =

100 %). Bei Überschreiten von 36,2 °C reduzierte sich die Zilienschlagfrequenz wieder um durchschnittlich ein Drittel (2 °C niedrigere Temperaturstufe = 100 %).

### 3.6.2 Temperaturabhängigkeit der Produktion von Cytokin- und Chemokin-mRNA

Die Stimulation mit *H. influenzae* erfolgte sowohl bei 24 °C als auch bei 37 °C. Die Stimulation bei 37 °C zeigte im Vergleich zur 37 °C-Negativkontrolle eine signifikante Hochregulation sämtlicher gemessener mRNA-Werte ( $p < 0,001$ ). Der größte Anstieg konnte bei MIP-2-mRNA und KC-mRNA auf 609,30 ( $\pm 13,41$ ) bzw. 300,64 ( $\pm 9,36$ ) nachgewiesen werden. CXCL5-mRNA, MCP-1-mRNA und IL6-mRNA stiegen auf 37,64 ( $\pm 3,19$ ), 35,21 ( $\pm 2,86$ ) bzw. 31,91 ( $\pm 2,29$ ). Im Gegensatz dazu führte die Stimulation bei 24 °C im Vergleich zur Negativkontrolle nur bei MIP-2-mRNA mit 4,91 ( $\pm 1,02$ ) zu einer signifikanten Steigerung ( $p < 0,001$ ). Die anderen Parameter erreichten nicht das Signifikanzniveau (alle  $p > 0,1$ ; MCP-1  $p > 0,2$ ). Bei Vergleich der Ergebnisse beider Temperaturstufen zeigten sich mit Ausnahme der mRNA von CXCL5 immer signifikant höhere Werte in den 37 °C-Proben (alle  $p < 0,001$ ; CXCL5  $p > 0,1$ ; s. Abb. 3.32).

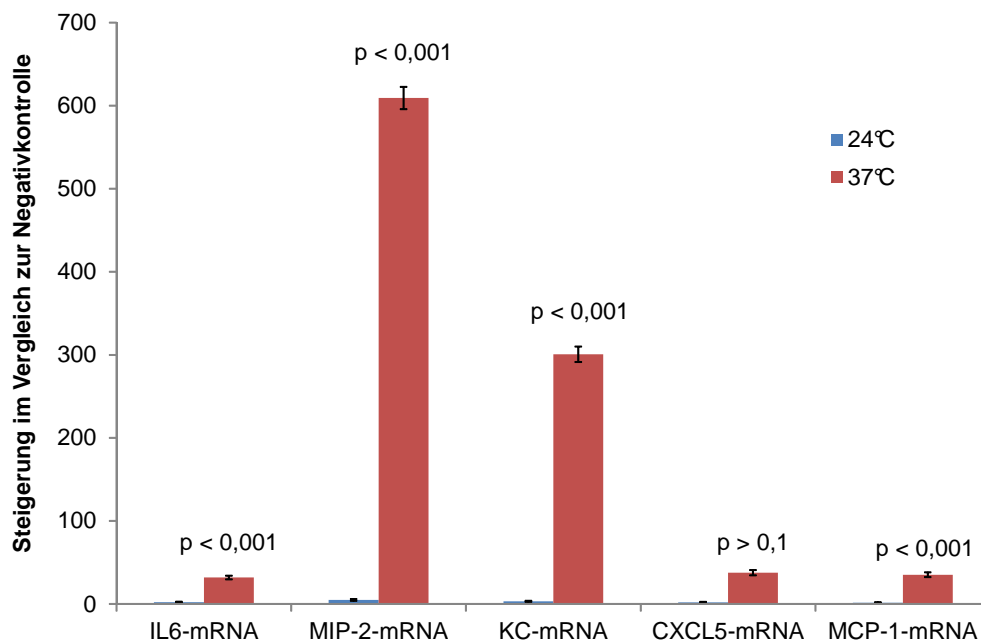


Abbildung 3.32: 2,5 h Inkubation mit  $1 \cdot 10^8$  *H. influenzae* pro viertel Trachea bei 24 °C bzw. 37 °C. Durchschnittliche Zunahme der IL6-, MIP-2-, KC-, CXCL5- und MCP-1-mRNA-Menge im Vergleich zur unstimulierten Probe. Vergleich von 24 °C und 37 °C mit der Negativkontrolle. Nachweis in  $n=5$  Tieren. Angaben als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. Durchführung des Wilcoxon-Tests.

# 4 Diskussion

## 4.1 Mechanismen des zilienvermittelten Transports

Obwohl jeden Tag über die Atemluft Bakterien, Viren und Kleinstpartikel in den Respirationstrakt gelangen, kommt es nur selten zu einer Entzündung. Als Abwehrmechanismus dient dem Organismus u. a. das System der mukoziliären Clearance: Mithilfe zilientragender Zellen, periziliärer Flüssigkeit und Mukus können eingeatmete Pathogene eliminiert, aus der Trachea heraustransportiert und entweder verschluckt oder herausgehustet werden.

### 4.1.1 Bedeutung von Mukus und genauer Regulation der periziliären Flüssigkeit

Die Literatur beschreibt ein Dogma der mukoziliären Clearance, welches besagt, dass Mukus für den Transport von Partikeln, Bakterien etc. essentiell ist: Ohne Mukus, nur mit Flüssigkeit, findet kein Transport statt. Der Mukus schwimmt nach dieser Theorie auf einer Flüssigkeitsschicht, die die Zilien umgibt, und nimmt bei seinem Transport in Richtung Larynx Partikel, Bakterien, Detritus etc. mit. Wichtig an dieser Flüssigkeitsschicht ist, dass sie mengenmäßig genau reguliert ist. Eine zu geringe Flüssigkeitsmenge bewirkt das Absinken des Mukus auf die zilientragenden Zellen, während ein Übermaß an periziliärer Flüssigkeit dazu führt, dass die Zilien den Mukus nicht mehr erreichen können (Eliezer et al., 1970; Widdicombe und Widdicombe, 1995). Knowles und Boucher (2002) postulieren im Hinblick auf die Effektivität des Zilienschlags, dass die Zilien von Säugetieren zu kurz seien, um direkt die periziliäre Flüssigkeit in Bewegung zu versetzen und dass diese nur sekundär durch Mukusbewegungen mitbewegt werde. Somit führen fehlender Mukus und Störungen der periziliären Flüssigkeitsregulation zum Zusammenbruch der mukoziliären Clearance (Matsui et al., 1998). Bezüglich der periziliären Flüssigkeit hat sich in den letzten Jahren eine von der bisherigen Literaturmeinung differierende These entwickelt: Tarran et al. (2001a) und Clunes und Boucher (2011) beschreiben, dass die exakte Regulation dieser periziliären Flüssigkeit nicht essentiell ist, da Mukus über Aufnahme bzw. Abgabe von Flüssigkeit sich der Umgebung anpasst.

Durch die vorliegende Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass dieses Modell dennoch teilweise falsch ist. So konnte trotz Entfernung des Mukus und Ersetzen der periziliären Flüssigkeit durch ein Übermaß an Hepes-gepufferter Ringerlösung ein Transport beobachtet werden. Dieser Transport war schnell und effektiv: Partikel, die an kleinen Mukusresten klebten,

wurden regelmäßig von den freien, nicht an Mukus gebundenen Partikeln überholt. Lediglich ein geringer Teil der Partikel wurde nicht transportiert. Dabei konnte der Transport von Partikeln, die mit ca. 4,5 µm Durchmesser etwas kleiner als Erythrozyten sind, außerdem von Bakterien (Kokken: ca. 0,5 - 1,5 µm Durchmesser; Stäbchen ca. 1,1 - 1,5 µm Durchmesser und 2 - 6 µm Länge (Goto et al., 2007) sowie von etwa virengroßen Partikeln (ca. 0,2 µm Durchmesser) nachgewiesen werden. Die Transportgeschwindigkeiten der größeren Partikel und die der Bakterien waren dabei nicht signifikant unterschiedlich. Lediglich die kleineren Partikel wurden langsamer transportiert ( $p < 0,001$ ). Eine mögliche Erklärung für den Unterschied zwischen dem seit Jahren geltenden Dogma und den Beobachtungen dieser und anderer Arbeiten aus dem gleichen Labor (König et al., 2009; Klein et al., 2009) mag in den unterschiedlichen Versuchsbedingungen liegen. So nutzten Eliezer et al. (1970) ein Setup, in dem zwar eine relative Luftfeuchtigkeit von 100 % herrschte, was aber vermutlich nicht verhinderte, dass die periziliäre Flüssigkeit nach Entfernung des Mukus abtransportiert wurde. Folglich brach der mukoziliäre Transport zusammen, da beide Komponenten (Mukus und periziliäre Flüssigkeit) fehlten. Nach erneuter Zugabe von Mukus ließ sich dann dort wieder der Partikeltransport nachweisen. Die Tatsache, dass diese Mukuszugabe wiederum eine Partikelbeförderung induzierte, lässt sich derart erklären, dass Mukus imstande ist, seinen Wassergehalt durch Aufnahme aus der Umgebung zu erhöhen bzw. durch Abgabe an die Umgebung zu reduzieren (Randell und Boucher, 2006). Somit wurde in besagtem Experiment (Eliezer et al., 1970) durch Zugabe des Mukus vermutlich wieder periziliäre Flüssigkeit generiert. Alternativ kann die vorhandene Menge für den Transport von Mukus ausgereicht haben, nicht aber für den Transport von Partikeln. Das in der vorliegenden Arbeit genutzte ex-vivo Modell der Trachea verfügte nicht mehr über Mukus, dafür aber über eine große Menge an Hepes-gepufferter Ringerlösung als Medium, das die periziliäre Flüssigkeit ersetzte bzw. ergänzte. Dort konnte mehrere hundert µm über dem Epithel ein Transport nachgewiesen werden, der durch eine zilienvermittelte Strömung entstand. Voraussetzung für den Partikeltransport ist somit primär die Existenz periziliärer Flüssigkeit und nicht die Anwesenheit von Mukus.

In der vorliegenden Arbeit wurde mithilfe einzelner Mukusreste das Transportverhalten von Mukus evaluiert. Bei Fokussierung auf das Epithel bzw. vor allem auf die zilientragenden Zellen konnte dort ein Transport von Mukus und Partikeln beobachtet werden. Dabei zeigte sich, dass Mukusstücke, die größer als Dynabeads waren, in dieser Ebene langsamer als die Partikel transportiert wurden. Außerdem konnte oberhalb der Mukusstücke der Transport von Partikeln beobachtet werden. Die eigenen Versuche zeigten weiterhin, dass Mukus bei Zunahme der periziliären Flüssigkeit, anders als in der Literatur beschrieben (Widdicombe und Widdicombe, 1995), nicht auf, sondern in der periziliären Flüssigkeit schwimmt. Die vorliegenden Untersuchungen dieser Arbeit zeigten weiterhin, dass der Transport bis 400 µm Abstand zum Epithel in Abwesenheit von Mukus möglich ist. Somit scheint – anders als angenommen (Widdicombe und Widdicombe, 1995; Wanner et al., 1996; Knowles und Boucher, 2002) – die genaue Regulation der periziliären Flüssigkeit, solange das Epithel

nicht austrocknet, weder im gewählten Modell noch im Modell mit Mukus wichtig zu sein. Kerem et al. (1999) konnten sogar nachweisen, dass ein krankheitsbedingtes Übermaß an periziliärer Flüssigkeit mit einer höheren Transportgeschwindigkeit assoziiert war.

Allerdings übernimmt auch der Mukus eine wichtige Aufgabe im Abwehrsystem der Atemwege. Neben der essentiellen Rolle in der Opsonisierung und damit letztendlich der Elimination von Pathogenen spielt er eine wichtige Rolle bei einer gestörten mukoziliären Clearance. Wenn Noxen, z. B. Zigarettenrauch, zu einer Schädigung der zilientragenden Zellen und damit zu einer Reduktion der mukoziliären Clearance führen, kann der Mukus diese Beeinträchtigung kompensieren. Es kommt zu einer vermehrten Mukusbildung und zu einem Auftauchen von Becherzellen auch in Lungenarealen, in denen diese Zellart physiologisch nicht vorkommt (Jeffery und Zhu, 2002). Durch rein mechanische Bindung und Heraushusten des Mukus-Pathogen-Konglomerats kann so ein Teil der Abwehrfunktion aufrecht erhalten werden. Die Pathogenelimination verlagert sich somit von zilienvermittelt bei gesunden zu mukusvermittelt bei kranken Individuen.

Insgesamt lässt sich schlussfolgern, dass Mukus in gesunden Atemwegen nicht essentiell für den Partikeltransport ist. Bei einigen Krankheiten, wie z. B. der cystischen Fibrose, kommt es sogar aufgrund des (veränderten) Mukus erst zu pulmonalen Problemen (Tarran et al., 2001b; Derichs et al., 2011). Bisher zielen Therapien der cystischen Fibrose vornehmlich auf die Verflüssigung des Mukus ab. In Anbetracht der Ergebnisse sollte geprüft werden, ob die Verhinderung der Mukusbildung eine wirksame Therapiealternative darstellen könnte.

#### 4.1.2 Transport durch direkten Kontakt mit Zilien

In den Versuchen dieser Arbeit wurden Partikel und Bakterien auf Höhe des Epithels transportiert. Auffällig war, dass die Partikel nicht mit einer konstanten Geschwindigkeit bewegt wurden. Diese setzte sich vielmehr aus unterschiedlich schnellen und langsamen Phasen zusammen. Die einzelnen Abschnitte korrelierten mit der Bewegung der Zilien, je nachdem zu welchem Zeitpunkt im Schlagzyklus der zilientragenden Zelle ein Partikel diese erreichte. So wurden Partikel, die während des *effective stroke* in Reichweite der Zilien kamen, direkt und mit einer höheren Geschwindigkeit transportiert als solche, die in der Phase des *recovery stroke* an den Zilien anlangten. Diese Partikel wurden während des *recovery stroke* zunächst nicht von der zilientragenden Zelle aktiv vorwärts, sondern teilweise sogar etwas zurück bewegt. Erst wenn diese Zelle in den *effective stroke* überging, wurden die Partikel, mittlerweile etwas abgebremst, wieder beschleunigt. Diese Beobachtungen zeigen, dass der Transport auf Höhe des Epithels durch direkten Kontakt zwischen Partikeln und Zilien zustande kommt. Ein weiteres Argument dafür ist auch, dass direkt auf Epithelhöhe die Transportgeschwindigkeiten signifikant mehr variierten als 25 µm entfernt vom Epithel, ein Bereich, in den keine zilientragende Zelle mehr hineinreicht. Dort zeigten sich die geringsten Unterschiede in den einzelnen Transportgeschwindigkeiten. Bei weiterer Entfernung vom Epithel stiegen diese zwar wieder an, unterschieden sich jedoch in den weiteren Entfer-

nungsstufen (50-100  $\mu\text{m}$ ) nicht mehr signifikant voneinander. Als Ursache für diesen Wiederanstieg können exogene Artefakte angenommen werden. Auch bei anderen Versuchen konnte beobachtet werden, dass Erschütterungen insbesondere in den weiter vom Epithel entfernten Schichten Bewegungen der Flüssigkeit (im Sinne von Wellen) auslösten.

Bisher ging man davon aus, dass die Zilien einer einzigen Trachea dieselbe Schlagfrequenz haben, da es sonst bei großen Abweichungen zu einem Zusammenbruch des Transports kommt (Gheber und Priel, 1989). Allerdings zeigte sich nun in der vorliegenden Arbeit, dass sich die Frequenz innerhalb der zehn gewählten Zellen signifikant unterschied ( $p < 0,001$ ). Es fanden sich dabei sowohl sehr langsam als auch sehr schnell schlagende Zellen (z. B. bei 30 °C: Minimum 7,5 Hz und Maximum 14,7 Hz) und einige, die im Mittelbereich lagen. Zwar gab es zwischen benachbarten im Vergleich zu nicht benachbarten Zellen eine signifikant höhere Übereinstimmung der Zilienschlagfrequenz, doch gelang insgesamt trotz teilweise höherer oder niedriger Zilienschlagfrequenz ein effektiver Partikeltransport.

Der Transport auf Epithelhöhe kam somit durch direkten Kontakt mit den Zilien zustande. Diese Art des Transports ist mit dem sog. „Crowdsurfing“ auf Popkonzerten vergleichbar. Dort springt eine Person beispielsweise von einer Bühne und wird auf den ausgestreckten Armen der Zuschauer durch den Raum bewegt (Wikipedia, 2010). Die Person entspricht in diesem Modell den Partikeln und die ausgestreckten Hände der Zuschauer den Zilien. Der Transport durch direkten Kontakt funktionierte unabhängig von der Partikelgröße. Die Transportgeschwindigkeit war lediglich für Fluoresbrite etwas niedriger als für Bakterien bzw. größere Partikel.

Wenn die Partikel sich über einem Tracheaareal mit nicht-zilientragenden bzw. zerstörten zilientragenden Zellen befanden, wurden sie dort allerdings nicht bzw. zumindest nicht durch direkten Kontakt mit den Zilien bewegt (s. Abb. 4.1, nächste Seite). Dennoch fand oft, sofern dieses Areal nicht zu groß war, ein (langsamer) Transport bis zur nächsten intakten zilientragenden Zelle statt. Dieser resultierte aus einer Flüssigkeitsströmung, die durch die Gesamtheit aller zilientragenden Zellen aufgebaut wurde (s. Kap. 4.1.3). Sobald sie die nächste funktionstüchtige zilientragende Zelle erreicht hatten, wurden sie wieder durch direkten Kontakt weitertransportiert.

### 4.1.3 Transport durch Flüssigkeitsströmung

Sleigh (1989) beschreibt, dass die Zilien generell nur bis zu ihrer zwei- bzw. dreifachen eigenen Länge, also noch ca. 12 - 18  $\mu\text{m}$  über dem Epithel, eine Strömung in der Flüssigkeitsschicht aufbauen können. Im Gegensatz dazu konnte in dieser Arbeit der zilienvermittelte Transport im gewählten ex-vivo Trachea-Modell auf Höhe des Epithels und durchschnittlich bis 400  $\mu\text{m}$  über dem Epithel verfolgt werden. Die Transportgeschwindigkeiten nahmen dabei mit zunehmender Entfernung vom Epithel ab. Da Zilien mit ihrer Gesamtlänge von etwa 6  $\mu\text{m}$  (Wanner et al., 1996) nur in epithelnahen Schichten durch direkten Kontakt für den Transport verantwortlich sein können, muss es einen weiteren Transportmechanismus

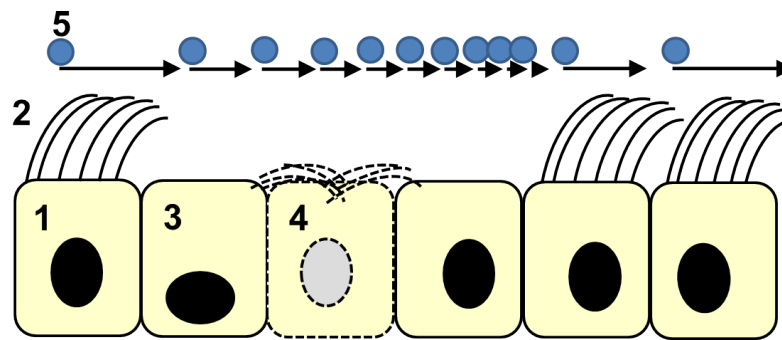


Abbildung 4.1: Zilienvermittelter Transport von Polystyrenpartikeln. Dargestellt ist das Trachealepithel mit Blick von der Seite: (1) entspricht einer zilientragenden Zelle, (2) deren Zilien. (3) stellt eine nicht-zilientragende Zelle und (4) eine zerstörte zilientragende Zelle dar. Die Pfeile entsprechen jeweils der Strecke, über die hinweg ein Partikel (5) durch einen *effective stroke* einer zilientragenden Zelle bewegt wurde. Über der zerstörten Zelle findet keine aktive Fortbewegung während des *effective stroke* der umgebenden Zellen statt. Aufgrund der Strömungsgeschwindigkeit sinken die Partikel nicht sofort ab, werden aber langsamer transportiert (Pfeile werden kürzer). Bei Unterschreiten einer gewissen Geschwindigkeit sinken sie ab. In dieser Darstellung erreichen sie gerade noch die nächste intakte, zilientragende Zelle, die sie wieder schneller transportiert (Pfeile werden wieder länger).

geben, was auch Hussong et al. (2008) beobachteten. Die Theorie, die sich aus den Ergebnissen der eigenen Versuche ableitet, ist, dass die Zilien durch ihren *effective stroke* nicht nur an ihrer Spitze eine Flüssigkeitsbewegung verursachen, sondern auch in dem darüber liegenden Bereich. Diese Flüssigkeitsströmung konnte in der vorliegenden Arbeit bis zu 400  $\mu\text{m}$  über dem Epithel beobachtet werden. Ein Argument für diese neue Theorie, dass eine solche Strömung von den Zilien hervorgerufen wird, ist die in den eigenen Versuchen beobachtete gleichmäßige, logarithmische Abnahme der Transportgeschwindigkeit bei zunehmender Entfernung von der Epithelebene. Offenbar scheiden andere Ursachen für die Strömung aus, da der Transport von Partikeln und damit diese Strömung zusammenbrechen, wenn die zilientragenden Zellen thermisch zerstört wurden. Außerdem konnte durch Zugabe von ATP, das bekanntlich die Zilienschlagfrequenz erhöht (Morse et al., 2001; König et al., 2009; Zhao et al., 2012), ein Anstieg der Transportgeschwindigkeit in allen Schichten nachgewiesen werden.

Diese Flüssigkeitsströmung weist noch weitere Spezifika auf. Die Strömungsmechanik beschreibt die Strömungsverhältnisse in Flüssigkeiten und Gasen mit der sog. Reynoldszahl  $Re$ , die (dimensionslos) das Verhältnis der Trägheitskräfte zu den Reibungskräften spezifiziert (Schlichting und Gersten, 2006c). Die Strömungsmechanik definiert eine sog. kritische Reynoldszahl (etwa 2300), oberhalb derer eine turbulente Strömung vorliegt. Unterhalb dieses Wertes spricht man von einer laminaren Strömung (eine geschichtete Strömung ohne jegliche Verwirbelung) (Schlichting und Gersten, 2006a). Strömungen bei kleinen Reynoldszahlen ( $Re < 200$ ) nennt man „schleichende Bewegungen“ (engl. *stokes flow*) (Schlichting und Gersten, 2006b), wie man sich am ehesten Bewegungen in zähflüssigem Sirup o. ä. vorstellen kann (Purcell, 1977).

Berechnet man die Reynoldszahlen für die Strömung durch die Zilienbewegung (s. Anhang A), so erhält man Werte im Bereich 0,2 bis 0,8. Das bedeutet, dass im vorliegenden Fall bei diesen sehr kleinen Reynoldszahlen eindeutig eine laminare Strömung mit „schleichenden Bewegungen“ vorliegt und Trägheitskräfte praktisch keine Rolle mehr spielen. Die Reibungskräfte dominieren.

Auch die aus den Messwerten abgeleitete Formel für die mittlere Geschwindigkeitsänderung des Transports von Dynabeads (s. Kap. 3.1.1.1) zeigt, dass es sich um eine laminare Strömung handelt. Somit beschreibt sie näherungsweise einen Ausschnitt des realen Geschwindigkeitsprofils. Eine weitere Modellentwicklung ist nicht trivial, wie auch Smith et al. (2008a) darstellen. Grundsätzlich beschreiben die Navier-Stokes-Gleichungen die Verhältnisse für die Bewegung in Flüssigkeiten und Gasen. Auch wenn sich diese bei sehr kleinen Reynoldszahlen auf die sog. *stokes equation* reduzieren, übersteigt eine Lösung der Differentialgleichungen zur Ermittlung der Strömungsverhältnisse den Rahmen der vorliegenden Arbeit. Die Erarbeitung eines mathematischen Modells wäre auch nur von begrenztem Interesse, da die realen Strömungsverhältnisse in einer Trachea durch den vorhandenen Mukus verändert sind. Auch die Auswirkungen des Setups (Mikroskop als obere Begrenzungsfläche mit Geschwindigkeit null) müssen bei der Übertragung auf reale Verhältnisse u. U. berücksichtigt werden. Schließlich ist die Annahme einer gleichförmigen Geschwindigkeit auf Zilienhöhe eine vereinfachende Annahme, deren Konsequenz für ein allgemeines Modell in weiteren Untersuchungen geklärt werden müsste.

Auf jeden Fall lässt sich aber aus den strömungsmechanischen Betrachtungen folgern, dass beide Transportarten (direkter zilienvermittelter Transport bzw. Transport durch laminäre Strömung verursacht durch den Zilienschlag) vorhanden sind. Die Existenz beider Transportarten – direkter Transport und Flüssigkeitsströmung – ließ sich auch durch weitere eigene Beobachtungen verifizieren: So war beispielsweise erkennbar, dass Dynabeads oberhalb von liegenden gebliebenen Dynabeads oder anderen Hindernissen transportiert werden konnten (s. Abb. 4.2, nächste Seite).

Daraus lässt sich schließen, dass an dieser Stelle zwar der direkte zilienvermittelte Transport gestört war, die von den umgebenden Zilien erzeugte Strömung aber den Transport an dieser Stelle aufrechterhielt. Von Epithelhöhe bis auf 25 µm darüber reduzierte sich die Variationsbreite der Einzeltransportgeschwindigkeiten sprunghaft und stieg danach wieder langsam an. Diese Reduktion spricht ebenfalls dafür, dass zwei verschiedene Transportarten vorliegen müssen: In höheren Schichten ist der Einfluss einer einzelnen zilientragenden Zelle geringer, so dass sich aus den vielen Einzelbewegungen eine Gesamtbewegung, i.e. Strömung, ergibt. Die erneute Zunahme der Variationsbreite oberhalb von 25 µm ist vermutlich äußeren Faktoren zuzuschreiben. So konnte beobachtet werden, dass Fußschritte neben dem Mikroskop ausreichten, um insbesondere in höheren Schichten ein Verwackeln des Mediums und somit der Partikel zu induzieren. Da somit in höheren Schichten die Empfindlichkeit für Erschütterungen anstieg, kann ein ebenfalls größerer Einfluss anderer Störfaktoren nicht sicher ausgeschlossen werden. Knowles und Boucher (2002) behaupten, dass

primär lediglich Mukus transportiert wird und dass durch Interaktionen zwischen ihm und der periziliären Flüssigkeit diese sekundär mitbewegt wird. Da in dem Modell der vorliegenden Arbeit aber kein Mukus mehr vorhanden, trotzdem aber ein sehr reger Transport messbar war, muss der Zilienschlag eine direkte Bewegung der periziliären Flüssigkeit induzieren.

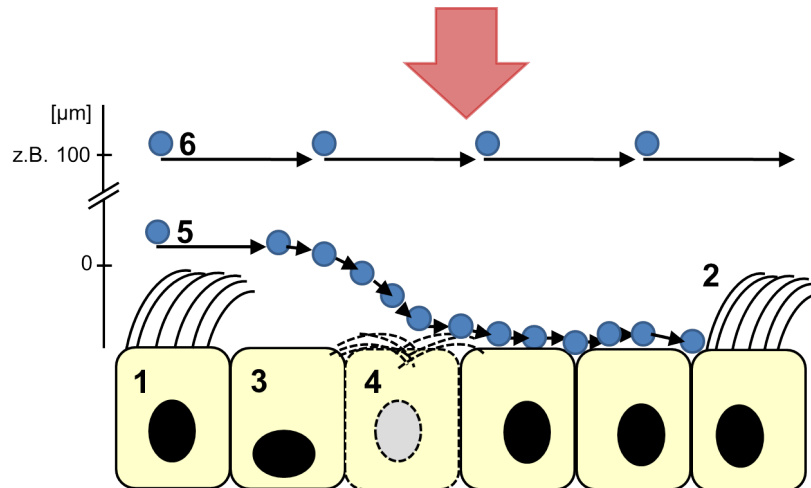


Abbildung 4.2: Transport von Polystyrenpartikeln durch Flüssigkeitsströmung. Dargestellt ist das Trachealepithel mit Blick von der Seite: (1) entspricht einer zilientragenden Zelle, (2) deren Zilien. (3) stellt eine nicht-zilientragende Zelle und (4) eine zerstörte zilientragende Zelle dar. Der rote Pfeil zeigt die Blickrichtung durch das Mikroskop. Die Pfeile entsprechen jeweils der Strecke, über die hinweg ein Partikel bewegt wurde. Über der zerstörten Zelle findet keine aktive Fortbewegung während des *effective stroke* der umgebenden Zellen statt. Aufgrund ihrer vorherigen Geschwindigkeit werden die Partikel (5) langsamer (Pfeile werden kürzer) und sinken ab. Im Gegensatz dazu können Partikel, die mit einigem Abstand zum Epithel durch die Flüssigkeitsströmung transportiert (6), auch über das Areal mit der zerstörten zilientragenden Zelle befördert werden. Somit ist zwar an dieser Stelle der direkte zilienvermittelte Transport behindert, der durch die Flüssigkeitsströmung jedoch intakt. Da die durch die Strömung transportierten Partikel die liegenden teilweise verdecken, müssen sich bei dieser Blickrichtung die Partikel in der Strömung oberhalb der liegenden befinden.

#### 4.1.4 Grenzen des zilienvermittelten Transports

Der Transport durch direkten Kontakt und durch die Flüssigkeitsströmung funktionierte unabhängig von der Partikelgröße. Die Transportgeschwindigkeit war lediglich für Fluoresbrite niedriger als für Bakterien bzw. größere Partikel. Somit scheint der zilienvermittelte Transport für einen bestimmten Größen- und Gewichtsbereich optimiert zu sein (s. Anhang A). So sinken zu große und/oder zu schwere Partikel wie Dynabeads vermehrt ab. Zu kleine Partikel wie Fluoresbrite können nur langsamer befördert werden. Ob aufgrund der vergleichbaren Größe von Fluoresbrite und Viren angenommen werden darf, dass Viren ebenfalls schlechter als Bakterien bzw. größere Partikel transportiert werden, könnte Gegenstand weiterer Forschungsarbeiten sein.

Im Gegensatz zur effektiven und sich nur in der Geschwindigkeit unterscheidenden Beförderung aller Partikel fiel in den eigenen Versuchen auf, dass sich das Anheftungsverhalten von Bakterien und Fluoresbrite von dem der Dynabeads unterschied. Dynabeads

hafteten nicht an Zilien, sie sanken bei Störungen des zilienvermittelten Transports in der Hebes-gepufferten Ringerlösung auf nicht-zilientragende Zellen ab. Bakterien und Fluoresbrite hingegen hafteten an Zilien und sanken bei guten Transportbedingungen nicht auf nicht-zilientragende Zellen ab. Sie blieben an den Zilien kleben, wurden bei jedem Zilienschlag mitbewegt und sogar bei Aufwirbeln des Mediums nicht wieder gelöst. Auch Roberts et al. (1984) konnten beobachten, dass sich diese relativ seltene Verbindung zwischen Zilien und Bakterien durch Austausch des Mediums nicht lösen ließ. Der Unterschied zwischen Bakterien und Fluoresbrite lag in der vorliegenden Arbeit in der Quantität ihres Anhaftens. Fluoresbrite hafteten zahlreicher als Bakterien. Dynabeads wiederum gingen aufgrund ihrer höheren Dichte im Flüssigkeitsstrom unter. Solange sie dies über einer funktionstüchtigen zilientragenden Zelle taten, wurden sie von dieser dennoch weiter transportiert. Befanden sie sich aber über einer nicht-zilientragenden Zelle, konnten sie bis auf diese absinken und von dort auch nicht wieder entfernt werden. Durch Aufwirbeln mittels Pipette gelangten sie wieder in den Strom, hafteten demnach – anders als Fluoresbrite und Bakterien – nicht fest an den Zellen.

Die Beobachtung, dass die untersuchten Bakterien (*E. coli* und *S. epidermidis*) – wenn überhaupt – an den Zilien hafteten, lässt sich nicht direkt durch die Literatur bestätigen, da entsprechende Untersuchungen nicht existieren. Es gibt lediglich solche, in denen es bei Inkubation mit *S. epidermidis* sowie auch *H. influenzae* zu einer Reduktion der Zilienschlagfrequenz kam (Ferguson et al., 1988; Shen et al., 2012). Die übrige Literatur beschreibt sowohl Beobachtungen verschiedener haftender Bakterien an nicht-zilientragenden (Loeb et al., 1988; Ketterer et al., 1999) als auch an zilientragenden Zellen (Roberts et al., 1984; Bakaletz et al., 1988; Ketterer et al., 1999). Dabei wurden aber immer *H. influenzae* und davon verschiedene Stämme (2019, 3198, 1479, 7502, B, nicht-typisierbar etc.) untersucht. Außerdem unterschied sich die Zellherkunft (Mensch, Hund, Affe, Chinchilla, Küken etc.). Somit scheint es kein einheitliches Anheftungsverhalten an zilien- bzw. nicht-zilientragende Zellen zu geben und stark von der Bakterienart abzuhängen. Ein weiterer beeinflussender Faktor kann die An- oder Abwesenheit von Mukus sein. Sofern Mukus vorhanden ist, haften Partikel oder Bakterien nur selten an den Zilien, da er nach gegenwärtigem Forschungsstand die Zilien und die Oberfläche der Atemwege gegeneinander abschirmt (Wanner et al., 1996; Rogers, 2007).

Für das in den eigenen Versuchen beobachtete Anhaften der avitalen Fluoresbrite lassen sich zwei Erklärungsansätze ableiten. Zum einen könnte das Material (Polystyren-Latex-Gemisch) ein Grund dafür sein, dass sie an Zilien haften. Dagegen spricht, dass Dynabeads auch aus Polystyrenen bestehen, aber nicht haften blieben. Bisher wurde in anderen Arbeiten der Einfluss des Partikelmaterials nur auf die mukoziliäre Clearance untersucht und es konnten in Abhängigkeit vom Material Unterschiede in den Transportgeschwindigkeiten ermittelt werden (Henning et al., 2010). Außerdem kann das in den Versuchen der vorliegenden Arbeit bemerkte Haftverhalten an der Größe der Partikel liegen: Die großen, schweren Dynabeads sanken ab (s. Anhang A), die kleinen, leichten Fluoresbrite und Bakterien ver-

blieben in den Schichten des Flüssigkeitstransports, hatten somit eher Kontakt zu den Zilien. Bakterien sanken erst nach Zusammenbruch des Transports auf nicht-zilientragende Zellen ab. In der Literatur finden sich ebenfalls nur Untersuchungen, die die mukoziliäre Clearance auf den Einfluss der Partikelgröße hin beschreiben. Dabei wurde kein Kausalzusammenhang zwischen Transportgeschwindigkeit und Partikelgröße gefunden (Smith et al., 2008b; Henning et al., 2010; Smith et al., 2011b). Hinsichtlich einer Korrelation zwischen Partikelgröße und Adhärenz insbesondere an zilien- oder nicht-zilientragenden Epithelzellen existieren keine Untersuchungen. Ein weiterer Aspekt, der einen möglichen Einfluss sowohl der Größe als auch des Materials aufzeigt, ist die Tatsache, dass Fluoresbrite in den eigenen Versuchen als einzige der eingesetzten Partikel und Bakterien zur Freisetzung von Mukusfäden führten. Da verschiedene Materialien und mechanische Stimulationen die Freisetzung von Mukus initiieren (Phipps und Richardson, 1976; Davis et al., 1982; Schultz et al., 1985), sollte es Gegenstand weiterer Forschungsarbeiten sein, die Versuche mit kleinen, latexfreien sowie mit größeren, latexhaltigen Partikeln durchzuführen, um zu klären, ob Größe und/oder Material entscheidend sind.

Wenn das Anheftungsverhalten primär von der Partikelgröße abhinge, könnten die eigenen Beobachtungen eventuell auf Viren übertragen werden. Danach wären der Transport von Viren und ihr (gelegentliches) Haften an den Zilien zu erwarten. Da in der vorliegenden Arbeit bereits nach wenigen Stunden zahlreiche Partikel hafteten, ist nach mehreren Tagen Exposition entsprechend eine Vielzahl haftender Partikel bzw. Viren zu erwarten. Aufgrund der Zerstörung von Wirtszellen durch Viren im Rahmen ihrer Fortpflanzung (Böcker und Heitz, 2008) ist in der Trachea ein irreversibler Funktionsverlust der Epithelzellen zu erwarten. Dieser Funktionsverlust macht sich am schnellsten als fehlender Zilienschlag bemerkbar, was zu den Ergebnissen von Pittet et al. (2010) passt, die nach sechs Tagen Infektion mit Influenzaviren keine mukoziliäre Bewegung mehr nachweisen konnten. Dafür, dass Viren Kontakt mit dem Trachealepithel haben und sogar daran haften, spricht außerdem die Tatsache, dass sie Mukussekretion und Mukostase fördern können (Vareille et al., 2011). Darüber werden virusvermittelt die mukoziliäre Clearance geschädigt und bakterielle Infektionen begünstigt. Diese Sekundärinfektionen schädigen die Lunge zusätzlich und beeinträchtigen dadurch wiederum die antiviralen Abwehrmechanismen (Vareille et al., 2011), so dass ein *Circulus vitiosus* entsteht.

## 4.2 Nachweis der epithelialen Entzündungskaskade

Wenn es nun ein Bakterium trotz guten Transports geschafft hat, sich an zilien- oder nicht-zilientragende Zellen zu binden, stellt sich die Frage, welche Konsequenzen sich daraus ergeben. Aufgrund des beobachteten Kontakts zwischen Bakterien und zilientragenden Zellen wäre eine Aktivierung dieser Zellen zu erwarten. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob diese Anheftung von Bakterien die Entzündungskaskade in den Epithelzellen

in Gang setzen kann, welche Einzelschritte dabei durchlaufen werden und welche weiteren Stimulantien eine inflammatorische Reaktion auslösen.

#### 4.2.1 Stimulation mit Bakterien

Nachdem bereits in den eigenen Versuchen der Transport gram-positiver und gram-negativer Bakterien im ex-vivo Trachea-Modell nachgewiesen werden konnte, wurde in der vorliegenden Arbeit ihre immunologische Wirkung auf gesundes Atemwegsepithel auf mRNA-Ebene untersucht.

*S. aureus* ATCC 29213 als gram-positiver Keim bewirkte im Rahmen der eigenen Versuche keine signifikante Steigerung der Cytokin- und Chemokin-mRNA (IL6, MIP-2, KC, CXCL5 und MCP-1) in den murinen Trachealepithelzellen im Vergleich zur Negativkontrolle. Ein Teil der Proben zeigte gar keine Steigerung. Für diese Ergebnisse bei Stimulation mit *S. aureus* scheint die Kombination zweier Faktoren plausibel. Zusammen mit der von Wilson et al. (1985) beschriebenen sofortigen Zilienschädigung durch *H. influenzae*, nicht aber durch *S. aureus*, bietet sich folgende Erklärung an: Ohne Zilienschädigung und damit weiterhin intaktem Transport hatte *S. aureus* keinen Kontakt zum Trachealepithel. Somit konnte es in der Trachea auch nicht zu einer immunologischen Reaktion kommen. Min et al. (2006) setzten in-vivo Sinusepithelzellen dem *S. aureus*-Enterotoxin A aus. Je höher die Konzentration des Enterotoxins A war, desto früher setzte die Reduktion der Zilienschlagfrequenz ein. Zwar lässt sich die verwendete Konzentration des Enterotoxins nicht direkt mit der eingesetzten Bakterienzahl vergleichen, doch legen diese Beobachtungen die Vermutung nahe, dass die gewählte Bakterienkonzentration in der gewählten Zeit (noch) nicht im Stande war, die Zilienschlagfrequenz zu reduzieren. Ein weiterer, auch additiv möglicher Grund ist, dass speziell *S. aureus* ATCC 29213 sein Äußeres derart maskiert, dass TLR2 ihn nicht erkennen können. Um diese Theorien weiter zu prüfen, sollte in nachfolgenden Forschungsarbeiten einerseits länger bzw. mit einer größeren Bakterienmenge stimuliert und ggf. mit verkleinertem *S. aureus* ATCC 29213 gearbeitet werden.

Als Vertreter der gram-negativen Bakterien führte die Stimulation mit *H. influenzae* (NTHI 2019) in den murinen Trachealepithelzellen zur 3,02- bis 63,59-fachen Erhöhung der Menge an Cytokin- und Chemokin-mRNA (IL6, MIP-2, KC und MCP-1) im Vergleich zur Negativkontrolle. Auch Tong et al. (2001) beobachteten, dass die Stimulation mit formalin角度tötetem *H. influenzae* (NTHI 2019) in HMEE-Zellen zu einer starken Erhöhung an Cytokin-mRNA (IL1 $\beta$ , IL6 und TNF $\alpha$ ) und einer moderaten Erhöhung an Chemokin-mRNA (IL8, MCP-1, MIP-1 $\beta$ ) führte. Dabei lagen deren Maxima bei 8 h, nur TNF $\alpha$  erreichte seines bereits nach 4 h. Somit ist es möglich, dass in der vorliegenden Arbeit nach 2,5 h Stimulation mit *H. influenzae* auch im ex-vivo Trachea-Modell die Maxima der Cytokin- und Chemokin-mRNA noch nicht erreicht wurden. Dafür spricht auch die Tatsache, dass LPS immer eine stärkere Immunantwort als *H. influenzae* induzierte: *H. influenzae* musste zunächst die ziliäre Abwehr der Trachea überwinden, um überhaupt in Kontakt mit den nicht-zilientragenden Zellen zu

treten. Dieser zeitliche Nachteil spiegelte sich in der Stärke der Immunantwort wider. Trotzdem sind längere Inkubationszeiten für dieses ex-vivo Trachea-Modell nicht geeignet, da in anderen eigenen, 6 h dauernden Versuchen sonst sehr sichere Stimulationen gehäuft nicht funktionierten. Vermutlich ist ein Zeitraum von 6 h unter den aktuellen Bedingungen für dieses Modell noch zu lang, weil das Medium nach 6 h sowohl in der Positiv- als auch in der Negativprobe vermutlich durch Kontamination während der Präparation und der Inkubation nicht mehr steril war. Da die Steigerung der Cytokin- und Chemokin-mRNA aber über das Verhältnis der Positiv- zur Negativprobe ermittelt wird, können sich dadurch falsch negative Werte ergeben. Das Problem der Sterilität könnte durch Etablierung eines in-vivo Modells behoben bzw. reduziert werden, da dort keine Präparation vor der Stimulation nötig ist und die Stimulation selbst auch in einem geschlossenen System stattfindet.

Wie bei den eigenen Transportversuchen mit *E. coli* und *S. epidermidis* beobachtet, blieben Bakterien, wenn überhaupt, an den Zilien kleben. Falls durch dieses Anhaften bereits eine Induktion der Entzündungskaskade ausgelöst wurde, wäre diese somit in den zilientragenden Zellen zu erwarten gewesen. Die Überprüfung erfolgte in der vorliegenden Arbeit durch Nachweis der Translokation von NF $\kappa$ B p65 in den Zellkern. Überraschenderweise konnte diese Translokation nach Stimulation mit *H. influenzae* nur in den nicht-zilientragenden Zellen nachgewiesen werden. Dass es sich bei den Zellen ohne NF $\kappa$ B p65-Translokation in den Zellkern um zilientragende Zellen handelte, ließ sich neben der optischen Kontrolle auch daran erkennen, dass deren Anzahl mit 30-40 % dem Anteil zilientragender Zellen in der Trachea entsprach (Pack et al., 1980). Diese Ergebnisse widersprechen zwar den eigenen Beobachtungen des Anheftungsverhalten, doch auch andere Veröffentlichungen zeigen diesbezüglich kein einheitliches Bild. Es gibt sowohl Beobachtungen verschiedener haftender Bakterien an nicht-zilientragenden Zellen (Loeb et al., 1988; Ketterer et al., 1999; beide: Zellkultur aus humanem Nasopharyngealgewebe bzw. primären humanen Atemwegsepithelzellen) als auch an zilientragenden Zellen (Bemis und Kennedy, 1981; Roberts et al., 1984; beide: Zellkultur aus Nasenmuscheln von Primaten bzw. Tracheen von Hunden). Die in den eigenen Versuchen beobachteten Translokationen von NF $\kappa$ B p65 nach Stimulation mit *H. influenzae* nur in nicht-zilientragenden Zellen erlauben drei Theorien: Entweder verfügen zilientragende Zellen (a) nicht über TLR4 auf ihrer Oberfläche oder (b) sie besitzen TLR4, die über gram-negative Bakterien in der gewählten Konzentration nie eine Signalkaskade induzieren, oder (c) die Zellen befinden sich in einer Art refraktärem Zustand, so dass sie bereits vorher Kontakt zum Stimulus hatten und daher im aktuellen Zustand keine Signalkaskade induziert wird.

Wäre durch die Präparation oder durch Einatmen von Bakterien bzw. anderen das Immunsystem stimulierenden Stoffen kurz- oder langfristig eine Stimulation der Epithelzellen erfolgt, befänden sich die zilientragenden Zellen noch in einem refraktären Zustand. Die effektive mukoziliäre Clearance verhindert im gesunden Organismus einen Kontakt zwischen nicht-zilientragenden Zellen und Stimulantien, wie z. B. Bakterien. Unter dieser Annahme entspräche die Stimulation mit *H. influenzae* ihrem Primärkontakt. Somit kann in den nicht-

zilienträgenden Zellen kein refraktärer Zustand vorliegen, jedoch in den zilienträgenden. Interessant wäre sicherlich gewesen, die Transportversuche direkt mit *H. influenzae* durchzuführen, doch in Ermangelung eines S2-Labors mit entsprechender Ausstattung musste darauf verzichtet und auf die Literatur verwiesen werden.

Ein weiteres Argument für (c), also den refraktären Zustand, ist, dass nach 90 min Stimulation prozentual die meisten Translokationen des gesamten Versuchs erreicht wurden und anschließend wieder, trotz Bestehen des Stimulus, abnahmen. Allerdings stellt sich dabei die Frage, ob diese Situation realistisch ist, wenn davon auszugehen ist, dass beim mRNA-Nachweis nach 2,5 h noch kein Maximum erreicht worden war und somit eine sehr große Zeitspanne zwischen Translokation und Cytokin- bzw. Chemokinantwort läge. Dieser refraktäre Zustand hat Ähnlichkeit mit der in der Literatur beschriebenen LPS-Toleranz in Makrophagen oder Monozyten (Beeson, 1947; Matsushita et al., 2010).

Dafür dass TLR4 auf zilienträgenden wie auf nicht-zilienträgenden Zellen vorkommen, aber nach Kontakt mit gram-negativen Bakterien keine Signalkaskade initiieren, sprechen die Ergebnisse von Soong et al. (2004). Sie konnten auf humanen 16HBE-Atemwegsepithelzellen viele TLR4 nachweisen, diese setzten aber keine Signalkaskade in Gang. Da diese Versuche aber allesamt in der Zellkultur und nicht wenigstens ex-vivo durchgeführt wurden, sollten ähnliche Versuche mindestens ex-vivo, besser noch in-vivo wiederholt werden.

Ein möglicher weiterer Grund für das Nichtansprechen auf Liganden des TLR4 könnte sein, dass in zilienträgenden Zellen die Stimulationsschwelle so hoch liegt, dass nur höhere Konzentrationen (z. B. mehr als  $3,51 \cdot 10^8$  Bakterien) eine Aktivierung auslösen können (b). Als einfachste Erklärung bietet sich auch die These an, dass TLR4 auf zilienträgenden Zellen nicht (apikal) vorkommen (a). Dazu gibt es noch keinerlei Untersuchungen. Diese Erklärung wäre aber denkbar, da Zilien in-vivo mit vielen stimulierenden Stoffen Kontakt haben, so dass eine permanente Aktivierung von  $\text{NF}\kappa\text{B}$  vorliegen müsste. Somit wäre der physiologische Sinn einer Aktivierung verfehlt, da die temporäre Aktivierung als Warn- und Verteidigungsfunktion nicht gegeben wäre, sondern die Zelle dauerhaft Bedrohung meldete. Diese dauerhafte Aktivierung wäre nicht nur überflüssig, sondern auch schädlich, da jede Immunabwehr auch Kollateralschäden mit sich bringt. Neben einem immunhistochemischen Nachweis von TLR4 auf zilienträgenden Zellen könnte in weiteren Versuchen der Einsatz einer stark erhöhten Bakterienanzahl Klarheit bringen. Falls sich dadurch eine Aktivierung von  $\text{NF}\kappa\text{B}$  nachweisen ließe, spräche vieles für einen der LPS-Toleranz vergleichbaren refraktären Zustand der zilienträgenden Zellen.

Eine weitere Erklärung für das Ausbleiben der Translokation von  $\text{NF}\kappa\text{B}$  in den Zellkern speziell zilienträgender Zellen bieten die Ergebnisse von Lin et al. (2005). Sie beobachteten, dass Foxj1 in B-Lymphozyten in der Lage ist, eine unangemessene Cytokinausschüttung von B-Zellen (partiell) zu verhindern, da Foxj1 ein Antagonist von  $\text{NF}\kappa\text{B}$  ist. Foxj1 wiederum ist ein Transkriptionsfaktor, der bei der Entwicklung und Differenzierung zilienträgender Zellen exprimiert wird (Thomas et al., 2010). Somit wäre es denkbar, dass Foxj1 in zilienträgenden Zellen imstande ist, die Cytokinausschüttung zu beeinflussen bzw. zu verhindern.

Nachdem gezeigt wurde, dass intakte Bakterien Epithelzellen aktivieren können, war der nächste Schritt, diese Aktivierung durch Bestandteile gram-negativer als auch gram-positiver Bakterien zu induzieren.

#### 4.2.2 Stimulation mit LPS

LPS wird als Bestandteil der äußeren Membran gram-negativer Bakterien durch TLR4 auf Epithelzellen erkannt (Wieland et al., 2005; Balamayooran et al., 2010). Nach Ligandenbindung kommt es zum Andocken von Adaptermolekülen an die cytoplasmatische TIR-Domäne des TLR4. Es folgt die Initiation der Signalkaskade mit Translokation von  $\text{NF}\kappa\text{B}$  in den Zellkern und Produktion proinflammatorischer Cytokine und Chemokine (Balamayooran et al., 2010). Das Adapterprotein MyD88 ist ein elementarer Bestandteil der TLR2- und TLR4-vermittelten Signalkaskade (Balamayooran et al., 2010).

Im ex-vivo Modell der murinen Trachea wurden in der vorliegenden Arbeit einzelne Schritte dieser Signalkaskade untersucht und verschiedene Stadien der Aktivierung durch LPS nachgewiesen. Zunächst konnte nach 30 min Stimulation mit LPS die maximale Translokation von  $\text{NF}\kappa\text{B}$  p65 in den Zellkern nachgewiesen werden. Diese Translokation fand, anders als erwartet, nicht in den zilientragenden, sondern ausschließlich in den nicht-zilientragenden Zellen statt. Die maximale Anzahl an Zellkernen mit Translokation des  $\text{NF}\kappa\text{B}$  p65 entsprach dabei etwa prozentual der Gesamtzahl an nicht-zilientragenden Zellen (Pack et al., 1980). Die Translokationen begannen nach 15 min und waren bereits nach 60 min nicht mehr nachweisbar. Auch Quinton et al. (2007) konnten in der Zellkultur mit MLE-15-Zellen bereits nach 10 min Inkubation mit bronchoalveolärer Lavage (BAL) aus Mäusen mit Pneumokokkenpneumonie  $\text{NF}\kappa\text{B}$  p65 im Zellkern nachweisen. Im Gegensatz dazu konnten Jany et al. (1995) in der Zellkultur mit 1HAEo-Zellen nach einer Inkubationszeit von 30, 90 und 180 min mit 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  LPS keine erhöhte  $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Bindung an die DNA nachweisen. Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz zwischen Literatur und eigenen Ergebnissen ist, dass 1HAEo-Zellen keine TLR4 auf ihrer Oberfläche besitzen. Außerdem wäre es denkbar, dass in der Zellkultur die Aktivierung von  $\text{NF}\kappa\text{B}$  zelltypspezifisch schneller (bereits nach 10 min) eintrat und daher nach 30 min schon wieder beendet war. Somit besitzen die verschiedenen Zellen der Zellkultur und die des ex-vivo Trachea-Modells eine unterschiedliche Reaktivität auf exogene Stimuli. Da die Zellkultur zwar technisch leichter zu standardisieren ist, das ex-vivo Trachea-Modell der vorliegenden Arbeit aber eher der Realität entspricht, sollte in weiteren Forschungsarbeiten dem ex-vivo Modell der Vorzug gegeben werden. Sowohl die Interaktionen zwischen den Zellen als auch das Zusammenspiel verschiedener Zellarten sind in der Trachea von elementarer Bedeutung und für das Verständnis ihrer Physiologie unerlässlich.

Da sich LPS im Unterschied zu *H. influenzae* als kleines, avitales Molekül in der Hepesgepufferten Ringerlösung lösen und gleichmäßig verteilen lässt, kann man davon ausgehen, dass es auch in der periziliären Flüssigkeit vorkommt und daher Kontakt zu allen Zellarten des Epithels haben wird. Folglich kann man davon ausgehen, dass die Beobachtungen der

auf eine einzige Zellart begrenzten bzw. eine Zellart aussparenden Translokationen nicht auf ein schlechteres Erreichen der zilientragenden Zellen zurückzuführen waren. Vielmehr mussten sie durch andere Faktoren verursacht sein. Auch hier sind die drei bereits genannten möglichen Erklärungen zu nennen: (a) es gibt keine TLR4 auf der Oberfläche zilientragender Zellen oder (b) sie besitzen TLR4, die über LPS oder gram-negative Bakterien in der gewählten Konzentration keine Signalkaskade induzieren, oder (c) sie befinden sich in einer Art refraktärem Zustand. Für refraktäre Zellen spräche auch hier, dass bei Stimulation mit LPS nach 30 min prozentual die meisten Translokationen des gesamten Versuchs erreicht wurden und deren Anzahl danach trotz Weiterbestehen des Stimulus wieder abnahmen. Um (b) zu überprüfen, müssten LPS-Konzentrationen größer 1 µg/ml verwendet werden. Die Tatsache, dass bereits nach 30 min LPS-Stimulation das Maximum der Translokationen von NF $\kappa$ B p65 – im Gegensatz zum Maximum von *H. influenzae* nach 90 min Stimulation – erreicht wurde, spricht auch dafür, dass *H. influenzae* zunächst die Zilienfunktion schädigen muss, um zu den nicht-zilientragenden Zellen zu gelangen und dort eine Entzündung zu induzieren.

Außerdem wurde in der vorliegenden Arbeit die Hochregulation bestimmter Gene durch Nachweis der mRNA (IL6, MIP-2, KC, CXCL5 und MCP-1) nachgewiesen. Die Stimulation erfolgte hierbei zunächst mit LPS, wonach mit Ausnahme von MCP-1 die Menge aller Parameter im Vergleich zur Negativkontrolle signifikant anstieg. Der Nachweis der mRNA erfolgte – stellvertretend für die eigentlichen Cytokine und Chemokine – aufgrund höherer Sensitivität und Geschwindigkeit (Huggett et al., 2005). Auch Barronschee et al. (2010) konnten in murinen Lungen einen Anstieg von IL6 und MIP-2 nach Stimulation mit LPS beobachten. Huang et al. (1992) konstatierten ebenfalls in Tracheahomogenisaten von Ratten nach LPS-Stimulation einen Anstieg der mRNA von KC und MIP-2. Jansson et al. (2004) konnten in der BAL von Ratten nach LPS-Stimulation sowohl erhöhte IL6 als auch erhöhte MCP-1-Werte messen. Jeyaseelan et al. (2004) fanden nach LPS-Stimulation in murinen Lungen erhöhte CXCL5-Werte. Somit scheint diese Stimulation auch in anderen Versuchsaufbauten und -tieren zu funktionieren. Der Kontakt der Atemwege mit LPS führt also zur Bildung und Freisetzung von Cytokinen und Chemokinen, die generell das Immunsystem aktivieren, aber auch neutrophile Granulozyten anlocken.

Da die Translokation von NF $\kappa$ B p65 in den Zellkern und die Cytokinproduktion über TLR MyD88-vermittelt ablaufen (Skerrett et al., 2004), wurde überprüft, ob dieses im ex-vivo Trachea-Modell durch Einsatz eines MyD88-Inhibitors verhindert werden konnte. Durch Einsatz eines MyD88-Inhibitors fiel die LPS-vermittelte Aktivität von NF $\kappa$ B p65 geringer aus. Im Vergleich der MyD88-gehemmten zur ungehemmten Trachea konnten nur noch in 5,49 % der Zellkerne, die in der Positivkontrolle translozierten, NF $\kappa$ B p65 transloziert im Zellkern nachgewiesen werden. Somit konnte auch in diesem Modell gezeigt werden, dass die Translokation TLR-vermittelt abläuft und dass MyD88 für die vollständige Antwort auf LPS-Stimulation erforderlich ist, was auch Wang et al. (2009) beobachteten. Außerdem wurde in den eigenen Versuchen der MyD88-Inhibitor eingesetzt, um die durch ihn reduzierte Menge

an Cytokin- und Chemokin-mRNA (IL6, MIP-2, KC, CXCL5 und MCP-1) zu evaluieren. Es zeigte sich, dass sich diese bei Einsatz eines MyD88-Inhibitors auf 21,5 % - 33,5 % der ungehemmten Probe (100 %) reduzierte. Diese reduzierte Cytokin- und Chemokinantwort und Einschränkung der Abwehr stellten auch Wang et al. (2009) und Skerrett et al. (2004) fest. Somit läuft auch diese Reaktion TLR-vermittelt ab, wobei MyD88 ein wichtiges Adapterprotein bei der Abwehr von Infektionen darstellt. Interessant ist der Unterschied in der Stärke der Hemmung durch den MyD88-Inhibitor. Ließ sich in der vorliegenden Arbeit die Translokation von NF $\kappa$ B p65 (Anfang der Kaskade) noch nahezu vollständig verhindern, konnten später nur noch 78,5 % - 66,5 % der Cytokin- und Chemokinantwort unterdrückt werden. Da der Aufbau der Versuche zum Nachweis der Translokation von NF $\kappa$ B p65 in den Zellkern und zum Nachweis von Cytokin- und Chemokin-mRNA bezüglich der Inkubation mit dem MyD88-Inhibitor identisch war, muss es eine weitere Möglichkeit geben, die Cytokin- und Chemokinproduktion, unabhängig von MyD88, zu aktivieren. Kawai et al. (2001) beschreiben einen MyD88-abhängigen und einen MyD88-unabhängigen Signalweg, ausgelöst durch LPS. Der erste führt über MyD88 zu einer frühen Induktion von NF $\kappa$ B. Der zweite führt über die Aktivierung des IRF3 zu einer späten Induktion von NF $\kappa$ B. Etwa 30 min nach dem MyD88-abhängigen Signalweg kommt es dann MyD88-unabhängig zeitlich verzögert zur Freisetzung von Cytokinen und Chemokinen (Covert et al., 2005). Somit wäre eine mögliche Erklärung für die stärkere Hemmung der Translokation von NF $\kappa$ B p65 in den eigenen Versuchen, dass aufgrund der Versuchsdauer von 30 min der MyD88-unabhängige Weg noch nicht ausreichend zur NF $\kappa$ B-Aktivierung führen konnte. Silverman und Maniatis (2001) schlussfolgern, dass MyD88 für den LPS-vermittelten Signalweg über TLR4 für die vollständige biologische Antwort benötigt wird.

Da nicht nur gram-negative Bakterien, die ja über TLR4 erkannt werden, sondern auch gram-positive Bakterien eingeatmet werden, wurde der TLR untersucht, der für das Erkennen gram-positiver Bakterienteile zuständig ist. TLR2 erkennen Lipoteichonsäure und Lipoproteine gram-positiver Bakterien (Lien et al., 1999; Yoshimura et al., 1999; Balamayooran et al., 2010). Die nachgeschaltete Signalkaskade, initiiert durch Ligandenbindung an TLR2, entspricht der des TLR4 (Balamayooran et al., 2010). Im ex-vivo Trachea-Modell wurde in den eigenen Versuchen die Stimulation mit dem TLR2-Agonisten Pam3Cys vorgenommen. Diese führte in den Epithelzellen zu einer Steigerung der Menge an IL6-, MIP-2- und KC-mRNA. Somit ist zumindest sichergestellt, dass die zu geringe Reaktion nach Stimulation mit *S. aureus* nicht auf das Fehlen von TLR2 im Trachealepithel der Maus zurückzuführen ist. Im Vergleich der stimulatorischen Potenzen von LPS und Pam3Cys zeigte sich, dass der Effekt durch LPS durchschnittlich 4,12-fach stärker war als der durch Pam3Cys, obwohl 10-fach mehr Pam3Cys eingesetzt wurde. Barrenschee et al. (2010) führten Versuche an murinen Lungen durch, die sie ventilierten und perfundierten. Über die Perfusion erfolgte ihre Stimulation. Sie beobachteten dabei, dass nach 60 min Stimulation mit LPS bzw. Pam3Cys im Perfusat IL6 und MIP-2 $\alpha$  nachzuweisen waren. Auch bei ihnen fiel die Antwort auf LPS stärker aus als die auf Pam3Cys. Eine Erklärung sowohl für die Ergebnisse der

vorliegenden Arbeit als auch die Angaben in der Literatur ist, dass LPS im Gegensatz zu Pam3Cys sowohl TLR4 als auch TLR2 aktiviert (Yang et al., 1998, Heine et al., 1999).

### 4.3 Einfluss der Temperatur auf Zilienschlagfrequenz und Entzündungskaskade

Die Zilienschlagfrequenz variiert mit Erhöhen oder Senken der Umgebungstemperatur. Bei Absenken der Temperatur nimmt die Frequenz ab (Smith et al., 2011a). Bisher ging man davon aus, dass die Zilien einer einzigen Trachea dieselbe Schlagfrequenz haben, da es sonst bei großen Abweichungen zu einem Zusammenbruch des Transports käme (Gheber und Priel, 1989). Allerdings zeigte sich nun in der vorliegenden Arbeit, dass sich die Frequenz innerhalb der zehn gewählten Zellen signifikant unterschied ( $p < 0,001$ ). Es gab dabei sowohl sehr langsam als auch sehr schnell schlagende Zellen und einige, die im Mittelbereich lagen. Im direkten Vergleich der Zilienschlagfrequenz benachbarter bzw. nicht-benachbarter Zellen zeigte sich, dass benachbarte Zellen mit durchschnittlich 83,73 % vs. 78,36 % (100 % entsprach der schnelleren Zelle) eine signifikant höhere Übereinstimmung aufwiesen ( $p = 0,004$ ). Somit muss es eine Kommunikation zwischen benachbarten zilien-tragenden Zellen geben. Außerdem konnte beobachtet werden, dass nicht alle Zellen ein einheitliches Temperaturoptimum hatten. Dieses variierte sowohl von Trachea zu Trachea als auch innerhalb einer einzelnen Trachea von Zelle zu Zelle.

Die Umgebungstemperatur variiert von Tag zu Tag und besonders stark von Sommer zu Winter und beeinflusst direkt die Zilienschlagfrequenz. Gleichzeitig häufen sich im Winter im Gegensatz zum wärmeren Sommer Atemwegsinfekte. Daher erfolgte die Stimulation der Trachea bei 37 °C bzw. 24 °C. Zu erwarten gewesen wäre einerseits eine Hochregulation der Immunantwort, da der Kontakt zwischen Pathogen und Trachealepithel durch die Abnahme der Zilienschlagfrequenz intensiver ausfällt. Andererseits und genauso plausibel wäre ein Herunterregulieren der Immunantwort zu erwarten gewesen, da die Gesamtaktivität der Zellen bereits heruntergefahren war, was sich an der reduzierten Zilienschlagfrequenz erkennen ließ. Es zeigte sich dabei, dass im ex-vivo Modell der Trachea durch die Stimulation bei 37 °C im Vergleich zu 24 °C in den Epithelzellen signifikant mehr IL6-, MIP-2-, KC- und MCP-1-mRNA gebildet wurde (14,51- bis 124,10-facher Wert).

Teilweise können die niedrigeren Werte bei 24 °C mit den Ergebnissen von Pichichero (1984) erklärt werden. Er fand heraus, dass bei Inkubation von humanen Epithelzellen mit *H. influenzae* bei 4 °C vs. 37 °C signifikant weniger Bakterien hafteten. Der Hauptgrund ist aber sicherlich ein anderer. Bei Senken der Temperatur reduziert sich nicht nur die Zilienschlagfrequenz, sondern die Gesamtaktivität der Zelle wird heruntergefahren und in einen Minimalzustand versetzt. Diesen Vorgang macht man sich beispielsweise nach einer erfolgreichen Reanimation zum Schonen der Zellen durch Kühlen des Körpers für 12 - 24 h zunutze (Deakin et al., 2010). Dort wird der Sauerstoffverbrauch der Gehirnzellen gesenkt, was einem

reduzierten Metabolismus der Zellen entspricht (McCullough et al., 1999). Daraus resultiert die Frage, welche Konsequenz diese reduzierte Immunreaktion auf den Organismus hat. Aibiki et al. (1999) und Kimura et al. (2002) stellten fest, dass es nach LPS-Stimulation bzw. traumatischer Schädigung auch beim Menschen bei kontrollierter Hypothermie (33 °C) zu einer reduzierten und verzögerten Cytokin- und Chemokinausschüttung kommt. Hypothermie wiederum ist beim Menschen mit einer erhöhten Rate respiratorischer Infektionen assoziiert (Yanagawa et al., 1998; Schwab et al., 2001). Diese Beobachtungen zeigen, dass die Hypothermie-verursachte reduzierte Cytokinausschüttung in Bezug auf die Immunabwehr einen Nachteil für den Organismus darstellt.

Kälte-induzierte Reduktion der Zilienschlagfrequenz sowie Cytokin- und Chemokinausschüttung führen zu einem schlechteren Abtransport von Bakterien und prädisponieren in Kombination mit einer häufig zu beobachtenden asymptomatischen Keimbesiedlung der menschlichen Atemwege (Muchmore et al., 1981; Mehta et al., 2000) für respiratorische Infekte. Somit könnte sich die starke Korrelation zwischen Kälte im Winter und erhöhter Infektrate der Atemwege (Felder, 1989; Danielides et al., 2002; Hajat et al., 2004) erklären lassen.

## 5 Zusammenfassung

Mit jedem Atemzug ist das Epithel der Trachea einer Vielzahl von Bakterien ausgesetzt, was jedoch in den meisten Fällen nicht zu einer Entzündung führt. Das Zusammenspiel zwischen Pathogenen und der mukoziliären Clearance, welche Transport, Anheftung und Signaltransduktion mitbestimmt, ist bislang nicht vollständig geklärt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle von Mukus beim zilienvermittelten Transport sowie die Interaktion von Bakterien mit gesundem Atemwegsepithel, insbesondere auf zellulärer Ebene und in Abhängigkeit von der Temperatur, genauer zu untersuchen.

Dafür wurden murine Tracheen entnommen und nach Entfernung des Mukus für die Dauer des jeweiligen Versuchs in temperiertem Medium gehalten. Mittels Hochgeschwindigkeitsmikroskopie wurde die Interaktion zwischen Bakterien und intaktem Atemwegsepithel untersucht. Um die Folgen dieser Interaktion in den betroffenen Zellen identifizieren zu können, wurden nach Gewinnung von Atemwegsepithel darin Änderungen der Expressionslevel proinflammatorischer Cytokine und Chemokine mittels quantitativer Real-Time-Polymerasekettenreaktion gemessen. Mithilfe einer Immunfluoreszenzfärbung in Verbindung mit Konfokalmikroskopie wurde die Translokation des Transkriptionsfaktors  $\text{NF}\kappa\text{B}$  in den Zellkern visualisiert und gezeigt, in welchen Zelltypen Bakterienkontakt eine Aktivierung auslöste.

Die vorliegende Arbeit zeigte, dass Bakterien und Partikel trotz einer fehlenden durchgängigen Mukusschicht zum einen durch direkten Kontakt mit den Zilien, zum anderen durch eine zilienvermittelte Strömung transportiert wurden. Dieser Transport verhinderte eine länger andauernde Interaktion zwischen Bakterien und Epithel. Dies erklärt, warum die Inkubation mit dem gram-positiven *S. aureus* zu keiner Erhöhung der mRNA-Expression proinflammatorischer Cytokine und Chemokine im Epithel führte. Im Gegensatz dazu induzierte die Inkubation mit dem gram-negativen, zilienschädigenden *H. influenzae* dort einen Anstieg dieser mRNA. Zudem erfolgte der Nachweis der nukleären Translokation von  $\text{NF}\kappa\text{B}$  nur in nicht-zilientragenden Zellen des Epithels. Diese selektive Translokation ließ sich ebenfalls nach Inkubation der Trachea mit dem bakteriellen Zellwandbestandteil Lipopolysaccharid beobachten. Bei Reduktion der Temperatur kam es nicht nur zu einer niedrigeren Zilienschlagfrequenz, sondern auch zu einer verringerten mRNA-Expression der proinflammatorischen Cytokine und Chemokine.

Die Beobachtungen zeigen, dass zilientragende Zellen trotz Abwesenheit von Mukus und eines Übermaßes an periziliärer Flüssigkeit Pathogene erfolgreich transportieren. Dies widerspricht der bisherigen Theorie der mukoziliären Clearance. Außerdem lässt sich erkennen, dass die initiale,  $\text{NF}\kappa\text{B}$ -abhängige epitheliale Entzündungsreaktion nur in nicht-

zientragenden Zellen induziert wird. Temperaturreduktion führt zu einer Abnahme der Zilienschlagfrequenz und der Bildung proinflammatorischer Cytokine und Chemokine, stellt somit einen doppelten Nachteil für die Immunabwehr dar. Dies könnte die erhöhte Rate respiratorischer Infektionen in der kalten Jahreszeit erklären.

# Literaturverzeichnis

- Aibiki M, Maekwa S, Ogura S, Kinoshita Y, Kawai N, Yokono S: Effect of moderate hypothermia on systemic and internal jugular plasma IL-6 levels after traumatic brain injury in humans. *J Neurotrauma* 16, 225–232 (1999)
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O: Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783–801 (2006)
- Bakaletz LO, Hoepf TM, DeMaria TF, Lim DJ: The effect of antecedent influenza A virus infection on the adherence of *Haemophilus influenzae* to chinchilla tracheal epithelium. *Am J Otolaryngol* 9, 127–134 (1988)
- Balamayooran T, Balamayooran G, Jeyaseelan S: Toll-like receptors and NOD-like receptors in pulmonary antibacterial immunity. *Innate Immun* 16, 201–210 (2010)
- Bals R, Hiemstra PS: Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens. *Eur Respir J* 23, 327–333 (2004)
- Barrenschee M, Lex D, Uhlig S: Effects of the TLR2 agonists MALP-2 and Pam3Cys in isolated mouse lungs. *PLoS ONE* 5, e13889 (2010)
- Beeson PB: Tolerance to bacterial pyrogens: 1. Factors influencing its development. *J Exp Med* 86, 29–38 (1947)
- Bemis DA, Kennedy JR: An improved system for studying the effect of *Bordetella bronchiseptica* on the ciliary activity of canine tracheal epithelial cells. *J Infect Dis* 144, 349–357 (1981)
- Böcker W, Heitz PU: *Pathologie*. 4. Aufl., 57, Elsevier, München, 2008
- Borthwick DW, West JD, Keighren MA, Flockhart JH, Innes BA, Dorin JR: Murine submucosal glands are clonally derived and show a cystic fibrosis gene-dependent distribution pattern. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20, 1181–1189 (1999)
- Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A: Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303, 1532–1535 (2004)
- Button B, Cai L, Ehre C, Kesimer M, Hill DB, Sheehan JK, Boucher RC, Rubinstein M: A periciliary brush promotes the lung health by separating the mucus layer from airway epithelia. *Science* 337, 937–941 (2012)
- Chang MS, McNinch J, Basu R, Simonet S: Cloning and characterization of the human neutrophil-activating peptide (ENA-78) gene. *J Biol Chem* 269, 25277–25282 (1994)

- Chimenti L, Morici G, Paternó A, Bonanno A, Siena L, Licciardi A, Veca M, Guccione W, Macaluso F, Bonsignore G, Bonsignore MR: Endurance training damages small airway epithelium in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 175, 442–449 (2007)
- Clunes MT, Boucher RC: Introduction to section I: overview of approaches to study cystic fibrosis pathophysiology. *Methods Mol Biol* 742, 3–14 (2011)
- Covert MW, Leung TH, Gaston JE, Baltimore D: Achieving stability of lipopolysaccharide-induced NF $\kappa$ B activation. *Science* 309, 1854–1857 (2005)
- Danielides V, Nousia CS, Patrikakos G, Bartzokas A, Lolis CJ, Milionis HJ, Skevas A: Effect of meteorological parameters on acute laryngitis in adults. *Acta Otolaryngol* 122, 655–660 (2002)
- Davis B, Roberts AM, Coleridge HM, Coleridge JC: Reflex tracheal gland secretion evoked by stimulation of bronchial C-fibers in dogs. *J Appl Physiol* 53, 985–991 (1982)
- Deakin CD, Nolan JP, Soar J, Sunde K, Koster RW, Smith GB, Perkins GD: Erweiterte Reanimationsmaßnahmen für Erwachsene (advanced life support). *Notfall Rettungsmed* 13, 559–620 (2010)
- Demoor T, Bracke KR, Dupont LL, Plantinga M, Bondue B, Roy MO, Lannoy V, Lambrecht BN, Brusselle GG, Joos GF: The role of ChemR23 in the induction and resolution of cigarette smoke-induced inflammation. *J Immunol* 186, 5457–5467 (2011)
- Derichs N, Jin BJ, Song Y, Finkbeiner W, Verkman A: Hyperviscous airway periciliary and mucous liquid layers in cystic fibrosis measured by confocal fluorescence photobleaching. *FASEB J* 25, 2325–2332 (2011)
- Donaldson SH, Bennett WD, Zeman KL, Knowles MR, Tarran R, Boucher RC: Mucus clearance and lung function in cystic fibrosis with hypertonic saline. *N Engl J Med* 354, 241–250 (2006)
- Eliezer N, Sadé J, Silberberg A, Nevo AC: The role of mucus in transport by cilia. *Am Rev Respir Dis* 102, 48–52 (1970)
- Elkins MR, Robinson M, Rose BR, Harbour C, Moriarty CP, Marks GB, Belousova EG, Xuan W, Bye PT: A controlled trial of long-term inhaled hypertonic saline in patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med* 354, 229–240 (2006)
- Ellison RT 3rd, Giehl TJ: Killing of gram-negative bacteria by lactoferrin and lysozyme. *J Clin Invest* 88, 1080–1091 (1991)
- Fakultät für Physik, Georg-August-Universität Göttingen : Lehrportal Physik – Das Gesetz von Stokes. 2011 URL <https://lp.uni-goettingen.de/get/text/4978> Zugriff am 12.11.2011
- Ferguson JL, McCaffrey TV, Kern EB, Martin WJ 2nd: The effects of sinus bacteria on human ciliated nasal epithelium in vitro. *Otolaryngol Head Neck Surg* 98, 299–304 (1988)

- Fielder CP: Effect of weather conditions on acute laryngotracheitis. *J Laryngol Otol* 103, 187–190 (1989)
- Gheber L, Priel Z: Synchronization between beating cilia. *Biophys J* 55, 183–191 (1989)
- Gheber L, Priel Z: On metachronism in ciliary systems: a model describing the dependence of the metachronal wave properties on the intrinsic ciliary parameters. *Cell Motil Cytoskeleton* 16, 167–181 (1990)
- Gibbons IR: The relationship between the fine structure and direction of beat in gill cilia of a lamellibranch mollusc. *J Biophys Biochem Cytol* 11, 179–205 (1961)
- Goto T, Sasayama S, Tsukii Y, Ichiyama S, Mitsuyama M, Honda T, Umeda A: Pathogenic Bacteria Database. 2007 URL <http://bac.hs.med.kyoto-u.ac.jp/> Zugriff am 11.02.2011
- Green A, Smallman LA, Logan AC, Drake-Lee AB: The effect of temperature on nasal ciliary beat frequency. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 20, 178–180 (1995)
- Hajat S, Bird W, Haines A: Cold weather and GP consultations for respiratory conditions by elderly people in 16 locations in the UK. *Eur J Epidemiol* 19, 959–968 (2004)
- Haziot A, Ferrero E, Köntgen F, Hijya N, Yamamoto S, Silver J, Stewart CL, Goyert SM: Resistance to endotoxin shock and reduced dissemination of gram-negative bacteria in CD14-deficient mice. *Immunity* 4, 407–414 (1996)
- Heine H, Kirschning CJ, Lien E, Monks BG, Rothe M, Golenbock DT: Cutting edge: cells that carry A null allele for toll-like receptor 2 are capable of responding to endotoxin. *J Immunol* 162, 6971–6975 (1999)
- Hemmers S, Teijaro JR, Arandjelovic S, Mowen KA: PAD4-mediated neutrophil extracellular trap formation is not required for immunity against influenza infection. *PLoS One* 6, e22043 (2011)
- Henning A, Schneider M, Nafee N, Muijjs L, Rytting E, Wang X, Kissel T, Grafahrend D, Klee D, Lehr CM: Influence of particle size and material properties on mucociliary clearance from the airways. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv* 23, 233–241 (2010)
- Holley MC, Afzelius BA: Alignment of cilia in immotile-cilia syndrome. *Tissue Cell* 18, 521–529 (1986)
- Huang S, Paulauskis JD, Godleski JJ, Kobzik L: Expression of macrophage inflammatory protein-2 and KC mRNA in pulmonary inflammation. *Am J Pathol* 141, 981–988 (1992)
- Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A: Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun* 6, 279–284 (2005)
- Hussong J, Faulhammer P, Noreikat K, Kummer W, Sharp KV, Lindken R, Westerweel J: Geschwindigkeitsmessung der durch Zilien in der Maus Trachea induzierten Strömung. Herbsttreffen DGP Sektion Zellbiologie, Freiburg (2008)

- Jansson AH, Eriksson C, Wang X: Lung inflammatory responses and hyperinflation induced by an intratracheal exposure to lipopolysaccharide in rats. *Lung* 182, 163–171 (2004)
- Jany B, Betz R, Schreck R: Activation of the transcription factor NF- $\kappa$ B in human tracheo-bronchial epithelial cells by inflammatory stimuli. *Eur Respir J* 8, 387–391 (1995)
- Jeffery P, Zhu J: Mucin-producing elements and inflammatory cells. *Novartis Found Symp* 248, 51–68 (2002)
- Jeyaseelan S, Chu HW, Young SK, Worthen GS: Transcriptional profiling of lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Infect Immun* 72, 7247–7256 (2004)
- Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S: Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* 11, 115–122 (1999)
- Kawai T, Takeuchi O, Fujita T, Inoue J, Mühlradt PF, Sato S, Hoshino K, Akira S: Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. *J Immunol* 167, 5887–5894 (2001)
- Kerem E, Bistrizter T, Hanukoglu A, Hofmann T, Zhou Z, Bennett W, MacLaughlin E, Barker P, Nash M, Quitell L, Boucher R, Knowles MR: Pulmonary epithelial sodium-channel dysfunction and excess airway liquid in pseudohypoaldosteronism. *N Engl J Med* 341, 156–162 (1999)
- Ketterer MR, Shao JQ, Hornick DB, Buscher B, Bandi VK, Apicella MA: Infection of primary human bronchial epithelial cells by *Haemophilus influenzae*: macropinocytosis as a mechanism of airway epithelial cell entry. *Infect Immun* 67, 4161–4170 (1999)
- Kimura A, Sakurada S, Ohkuni H, Todome Y, Kurata K: Moderate hypothermia delays proinflammatory cytokine production of human peripheral blood mononuclear cells. *Crit Care Med* 30, 1499–1502 (2002)
- Klein MK, Haberberger RV, Hartmann P, Faulhammer P, Lips KS, Krain B, Wess J, Kummer W, König P: Muscarinic receptor subtypes in cilia-driven transport and airway epithelial development. *Eur Respir J* 33, 1113–1121 (2009)
- Knowles MR, Boucher RC: Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *J Clin Invest* 109, 571–577 (2002)
- König P, Krain B, Krasteva G, Kummer W: Serotonin increases cilia-driven particle transport via an acetylcholine-independent pathway in the mouse trachea. *PLoS One* 4, e4938 (2009)
- Kretschmer S: Untersuchung der Dynamik von Zellen des Immunsystems in der Trachea der Maus ex vivo mittels Zwei-Photonen Laser Scanning Mikroskopie. *Rer. nat. Diss.* Universität zu Lübeck (2012)
- Leopold PL, O'Mahony MJ, Lian XJ, Tilley AE, Harvey BG, Crystal RG: Smoking is associated with shortened airway cilia. *PLoS ONE* 4, e8157 (2009)

- Lien E, Sellati TJ, Yoshimura A, Flo TH, Rawadi G, Finberg RW, Carroll JD, Espevik T, Ingalls RR, Radolf JD, Golenbock DT: Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products. *J Biol Chem* 274, 33419–33425 (1999)
- Lin L, Brody SL, Peng SL: Restraint of B cell activation by Foxj1-mediated antagonism of NF- $\kappa$ B and IL-6. *J Immunol* 175, 951–958 (2005)
- Linck RW, Amos LA, Amos WB: Localization of tektin filaments in microtubules of sea urchin sperm flagella by immunoelectron microscopy. *J Cell Biol* 100, 126–135 (1985)
- Loeb MR, Connor E, Penney D: A comparison of the adherence of fimbriated and nonfimbriated *Haemophilus influenzae* type b to human adenoids in organ culture. *Infect Immun* 56, 484–489 (1988)
- Luck D: Genetic and biochemical dissection of the eucaryotic flagellum. *J Cell Biol* 98, 789–794 (1984)
- Lüllmann-Rauch R, Paulsen F: Taschenlehrbuch Histologie. 4. Aufl., 22-30, Thieme, Stuttgart, 2012
- Mäkinen TM, Juvonen R, Jokelainen J, Harju TH, Peitso A, Bloigu A, Silvennoinen-Kassinen S, Leinonen M, Hassi J: Cold temperature and low humidity are associated with increased occurrence of respiratory tract infections. *Respir Med* 103, 456–462 (2009)
- Manukyan M, Triantafilou K, Triantafilou M, Mackie A, Nilsen N, Espevik T, Wiesmüller KH, Ulmer AJ, Heine H: Binding of lipopeptide to CD14 induces physical proximity of CD14, TLR2 and TLR1. *Eur J Immunol* 35, 911–921 (2005)
- Matsui H, Randell SH, Peretti SW, Davis CW, Boucher RC: Coordinated clearance of periciliary liquid and mucus from airway surfaces. *J Clin Invest* 102, 1125–1131 (1998)
- Matsushita H, Ohta S, Shiraishi H, Suzuki S, Arima K, Toda S, Tanaka H, Nagai H, Kimoto M, Inokuchi A, Izuhara K: Endotoxin tolerance attenuates airway allergic inflammation in model mice by suppression of the T-cell stimulatory effect of dendritic cells. *Int Immunol* 22, 739–747 (2010)
- Maurer WHL, Lehmacher W: Multiple comparisons in drug clinical trials and preclinical assays: a priori ordered hypothesis. Vollmar J (ed). *Biometrie in der Chemisch-Pharmazeutischen Industrie*, 3-18, Fischer, Stuttgart, 1995
- McCullough JN, Zhang N, Reich DL, Juvonen TS, Klein JJ, Spielvogel D, Ergin MA, Griep RB: Cerebral metabolic suppression during hypothermic circulatory arrest in humans. *Ann Thorac Surg* 67, 1895–1899 (1999)
- McDonald JH: *Handbook of Biological Statistics*. 2. Aufl., 198-201, Sparky House Publishing, Baltimore, 2009
- McWhirter SM, Fitzgerald KA, Rosains J, Rowe DC, Golenbock DT, Maniatis T: IFN-regulatory factor 3-dependent gene expression is defective in Tbk1-deficient mouse embryonic fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 233–238 (2004)

- Mehta SK, Pierson DL, Cooley H, Dubow R, Lugg D: Epstein-Barr virus reactivation associated with diminished cell-mediated immunity in antarctic expeditioners. *J Med Virol* 61, 235–240 (2000)
- Min YG, Oh SJ, Won TB, Kim YM, Shim WS, Rhee CS, Min JY, Dhong HJ: Effects of staphylococcal enterotoxin on ciliary activity and histology of the sinus mucosa. *Acta Otolaryngol* 126, 941–947 (2006)
- Mizuno N, Taschner M, Engel BD, Lorentzen E: Structural studies of ciliary components. *J Mol Biol* 422, 163–180 (2012)
- Morse DM, Smullen JL, Davis CW: Differential effects of UTP, ATP, and adenosine on ciliary activity of human nasal epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 280, 1485–1497 (2001)
- Muchmore HG, Parkinson AJ, Humphries JE, Scott EN, McIntosh D, Scott LV, Cooney MK, Miles JA: Persistent parainfluenza virus shedding during isolation at the South Pole. *Nature* 289, 187–189 (1981)
- Murphy K, Travers P, Walport M: *Janeway's Immunobiology*. 7. Aufl., Teil I, Kapitel 2, Garland Science, Taylor & Francis Group, New York, 2008a
- Murphy K, Travers P, Walport M: *Janeway's Immunobiology*. 7. Aufl., Teil IV, Kapitel 11, Garland Science, Taylor & Francis Group, New York, 2008b
- Murphy K, Travers P, Walport M: *Janeway's Immunobiology*. 7. Aufl., Teil III, Kapitel 6, Garland Science, Taylor & Francis Group, New York, 2008c
- Nagai Y, Akashi S, Nagafuku M, Ogata M, Iwakura Y, Akira S, Kitamura T, Kosugi A, Kimoto M, Miyake K: Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat Immunol* 3, 667–672 (2002)
- O'Neill LA, Bowie AG: The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 7, 353–364 (2007)
- Pack RJ, Al-Ugaily LH, Morris G, Widdicombe JG: The distribution and structure of cells in the tracheal epithelium of the mouse. *Cell Tissue Res* 208, 65–84 (1980)
- Papi A, Luppi F, Franco F, Fabbri LM: Pathophysiology of exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 3, 245–251 (2006)
- Peri F, Piazza M, Calabrese V, Damore G, Cighetti R: Exploring the LPS/TLR4 signal pathway with small molecules. *Biochem Soc Trans* 38, 1390–1395 (2010)
- Phipps RJ, Richardson PS: The effects of irritation at various levels of the airway upon tracheal mucus secretion in the cat. *J Physiol* 261, 563–581 (1976)
- Pichichero ME: Adherence of *Haemophilus influenzae* to human buccal and pharyngeal epithelial cells: relationship to pilation. *J Med Microbiol* 18, 107–116 (1984)
- Pittet LA, Hall-Stoodley L, Rutkowski MR, Harmsen AG: Influenza virus infection decreases tracheal mucociliary velocity and clearance of *Streptococcus pneumoniae*. *Am J Respir Cell Mol Biol* 42, 450–460 (2010)

- Proud D, Leigh R: Epithelial cells and airway diseases. *Immunol Rev* 242, 186–204 (2011)
- Purcell EM: Life at Low Reynolds Number. *Am J Phys* 45, 3–11 (1977)
- Quinton LJ, Jones MR, Simms BT, Kogan MS, Robson BE, Skerrett SJ, Mizgerd JP: Functions and regulation of NF- $\kappa$ B RelA during pneumococcal pneumonia. *J Immunol* 178, 1896–1903 (2007)
- Randell SH, Boucher RC: Effective mucus clearance is essential for respiratory health. *Am J Respir Cell Mol Biol* 35, 20–28 (2006)
- Roberts M, Jacobs RF, Haas JE, Smith AL: Adherence of *Haemophilus influenzae* to monkey respiratory tissue in organ culture. *J Gen Microbiol* 130, 1437–1447 (1984)
- Rogers DF: Physiology of airway mucus secretion and pathophysiology of hypersecretion. *Respir Care* 52, 1134–1146 (2007)
- Sajjan U, Wang Q, Zhao Y, Gruenert DC, Hershenson MB: Rhinovirus disrupts the barrier function of polarized airway epithelial cells. *Am J Respir Crit Care Med* 178, 1271–1281 (2008)
- Sanderson MJ, Dirksen ER: A versatile and quantitative computer-assisted photoelectronic technique used for the analysis of ciliary beat cycles. *Cell Motil* 5, 267–292 (1985)
- Schlichting H, Gersten K: Grenzschicht-Theorie. 10. Aufl., Kap. 1.4, Springer, Berlin, 2006a
- Schlichting H, Gersten K: Grenzschicht-Theorie. 10. Aufl., Kap. 4.5, Springer, Berlin, 2006b
- Schlichting H, Gersten K: Grenzschicht-Theorie. 10. Aufl., Kap. 1.3, Springer, Berlin, 2006c
- Schultz HD, Roberts AM, Bratcher C, Coleridge HM, Coleridge JC, Davis B: Pulmonary C-fibers reflexly increase secretion by tracheal submucosal glands in dogs. *J Appl Physiol* 58, 907–910 (1985)
- Schwab S, Georgiadis D, Berrouschot J, Schwellinger PD, Graffagnino C, Mayer SA: Feasibility and safety of moderate hypothermia after massive hemispheric infarction. *Stroke* 32, 2033–2035 (2001)
- Shen JC, Cope E, Chen B, Leid JG, Cohen NA: Regulation of murine sinonasal cilia function by microbial secreted factors. *Int Forum Allergy Rhinol* 2, 104–110 (2012)
- Shi Z, Cai Z, Sanchez A, Zhang T, Wen S, Wang J, Yang J, Fu S, Zhang D: A novel Toll-like receptor that recognizes vesicular stomatitis virus. *J Biol Chem* 286, 4517–4524 (2011)
- Silbernagl S, Despopoulos A: Taschenatlas Physiologie. 8. Aufl., 112, Thieme, Stuttgart, 2012
- Silverman N, Maniatis T: NF- $\kappa$ B signaling pathways in mammalian and insect innate immunity. *Genes Dev* 15, 2321–2342 (2001)
- Simet SM, Sisson JH, Pavlik JA, Devasure JM, Boyer C, Liu X, Kawasaki S, Sharp JG, Rennard SI, Wyatt TA: Long-term cigarette smoke exposure in a mouse model of ciliated epithelial cell function. *Am J Respir Cell Mol Biol* 43, 635–640 (2010)

- Skerett SJ, Liggitt HD, Hajjar AM, Wilson CB: Cutting edge: myeloid differentiation factor 88 is essential for pulmonary host defense against *Pseudomonas aeruginosa* but not *Staphylococcus aureus*. *J Immunol* 172, 3377–3381 (2004)
- Sleigh MA: Adaptations of ciliary systems for the propulsion of water and mucus. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* 94, 359–364 (1989)
- Sleigh MA, Blake JR, Liron N: The propulsion of mucus by cilia. *Am Rev Respir Dis* 137, 726–741 (1988)
- Smith CM, Hirst RA, Bankart MJ, Jones DW, Easton AJ, Andrew PW, O'Callaghan C: Cooling of cilia allows functional analysis of the beat pattern for diagnostic testing. *Chest* 140, 186–190 (2011a)
- Smith DJ, Gaffney EA, Blake JR: Modelling mucociliary clearance. *Respir Physiol Neurobiol* 163, 178–188 (2008a)
- Smith JR, Bailey MR, Etherington G, Shutt AL, Youngman MJ: Effect of particle size on slow particle clearance from the bronchial tree. *Exp Lung Res* 34, 287–312 (2008b)
- Smith JR, Bailey MR, Etherington G, Shutt AL, Youngman MJ: An experimental study of clearance of inhaled particles from the human nose. *Exp Lung Res* 37, 109–129 (2011b)
- Soong G, Reddy B, Sokol S, Adamo R, Prince A: TLR2 is mobilized into an apical lipid raft receptor complex to signal infection in airway epithelial cells. *J Clin Invest* 113, 1482–1489 (2004)
- Spaniol V, Troller R, Aebi C: Physiologic cold shock increases adherence of *Moraxella catarrhalis* to and secretion of interleukin 8 in human upper respiratory tract epithelial cells. *J Infect Dis* 200, 1593–1601 (2009)
- Sue-Chu M: Winter sports athletes: long-term effects of cold air exposure. *Br J Sports Med* 46, 397–401 (2012)
- Tarran R, Grubb BR, Gatzky JT, Davis CW, Boucher RC: The relative roles of passive surface forces and active ion transport in the modulation of airway surface liquid volume and composition. *J Gen Physiol* 118, 223–236 (2001a)
- Tarran R, Grubb BR, Parsons D, Picher M, Hirsh AJ, Davis CW, Boucher RC: The CF salt controversy: in vivo observations and therapeutic approaches. *Mol Cell* 8, 149–158 (2001b)
- Thomas J, Morlé L, Soulavie F, Laurençon A, Sagnol S, Durand B: Transcriptional control of genes involved in ciliogenesis: a first step in making cilia. *Biol Cell* 102, 499–513 (2010)
- Tong HH, Chen Y, James M, Van Deusen J, Welling DB, DeMaria TF: Expression of cytokine and chemokine genes by human middle ear epithelial cells induced by formalin-killed *Haemophilus influenzae* or its lipooligosaccharide htrB and rfaD mutants. *Infect Immun* 69, 3678–3684 (2001)

- Vareille M, Kieninger E, Edwards MR, Regamey N: The airway epithelium: soldier in the fight against respiratory viruses. *Clin Microbiol Rev* 24, 210–229 (2011)
- Wang X, Stridh L, Li W, Dean J, Elmgren A, Gan L, Eriksson K, Hagberg H, Mallard C: Lipopolysaccharide sensitizes neonatal hypoxic-ischemic brain injury in a MyD88-dependent manner. *J Immunol* 183, 7471–7477 (2009)
- Wanner A, Slathé M, O’Riordan TG: Mucociliary clearance in the airways. *Am J Respir Crit Care Med* 154, 1868–1902 (1996)
- Widdicombe JH, Widdicombe JG: Regulation of human airway surface liquid. *Respir Physiol* 99, 3–12 (1995)
- Wieland CW, Florquin S, Maris NA, Hoebe K, Beutler B, Takeda K, Akira S, van der Poll T: The MyD88-dependent, but not the MyD88-independent, pathway of TLR4 signaling is important in clearing nontypeable haemophilus influenzae from the mouse lung. *J Immunol* 175, 6042–6049 (2005)
- Wikipedia : Crowdsurfing. 2010 URL <http://de.wikipedia.org/wiki/Crowdsurfing> Zugriff am 14.02.2011
- Wilson GB, Jahn TL, Fonseca JR: Studies on ciliary beating of frog pharyngeal epithelium in vitro: I. Isolation and ciliary beat of single cells. *Trans Am Microsc Soc* 94, 43–57 (1975)
- Wilson R, Roberts D, Cole P: Effect of bacterial products on human ciliary function in vitro. *Thorax* 40, 125–131 (1985)
- Yanagawa Y, Ishihara S, Norio H, Takino M, Kawakami M, Takasu A, Okamoto K, Kaneko N, Terai C, Okada Y: Preliminary clinical outcome study of mild resuscitative hypothermia after out-of-hospital cardiopulmonary arrest. *Resuscitation* 39, 61–66 (1998)
- Yang RB, Mark MR, Gray A, Huang A, Xie MH, Zhang M, Goddard A, Wood WI, Gurney AL, Godowski PJ: Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. *Nature* 395, 284–288 (1998)
- Yoshimura A, Lien E, Ingalls RR, Tuomanen E, Dziarski R, Golenbock D: Cutting edge: recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2. *J Immunol* 163, 1–5 (1999)
- Zhao KQ, Cowan AT, Lee RJ, Goldstein N, Droguett K, Chen B, Zheng C, Villalon M, Palmer JN, Kreindler JL, Cohen NA: Molecular modulation of airway epithelial ciliary response to sneezing. *FASEB J* 26, 3178–3187 (2012)

# Anhang

# A Berechnung der Reynoldszahlen

Osborne Reynolds stellte 1883 das nach ihm benannte Reynoldsche Ähnlichkeitsgesetz auf, das besagt, dass zwei mechanische Strömungen ähnlich sind, wenn ihre Reynoldszahlen gleich sind. Die Reynoldszahl charakterisiert das Verhältnis der Trägheitskräfte zu den Reibungskräften und ist definiert (Schlichting und Gersten, 2006c) als

$$Re = \frac{\rho v l}{\eta}. \quad (\text{A.1})$$

In Gleichung A.1 kennzeichnet  $\rho$  die Dichte (im vorliegenden Fall) der Flüssigkeit,  $v$  die Geschwindigkeit eines bewegten Körpers in der stehenden Flüssigkeit bzw. die Geschwindigkeit der Flüssigkeit um einen unbewegten Körper sowie  $l$  eine charakteristische Längenabmessung, z. B. der Durchmesser eines Rohres. Die Viskosität der Flüssigkeit wird mit  $\eta$  angegeben.

Betrachtet man die Verhältnisse bei der Bewegung von Dynabeads und Fluoresbrite durch einen ziliären Strom, so ergibt sich eine maximale Geschwindigkeit  $v_{max}$  von etwa 80  $\mu\text{m/s}$  auf Höhe des Epithels unter ATP-Zugabe sowie eine minimale Geschwindigkeit  $v_{min}$  von etwa 20  $\mu\text{m/s}$  (ohne ATP) auf einer Höhe 400  $\mu\text{m}$  über dem Epithel (vgl. Kap. 3.1.1.1). Die Dichte der HEPES-gepufferten Ringerlösung entspricht in erster Näherung der Dichte von Wasser ( $\rho_{\text{H}_2\text{O}} = 1000 \text{ kg/m}^3$ ). Auch die Viskosität der Ringerlösung ist mit der von Wasser vergleichbar ( $\eta_{\text{H}_2\text{O}} = 0,001 \text{ kg/m}\cdot\text{s}$ ). Für die charakteristische Länge  $l$  wählt man die Länge der präparierten Trachea von ca. 1 cm.

Mit Gleichung A.1 lässt sich der Bereich der Reynoldszahlen im vorliegenden Versuch berechnen. Sie liegen zwischen  $Re_{max} = 0,8$  bei  $v_{max}$  und  $Re_{min} = 0,2$  bei  $v_{min}$ . Bei diesen kleinen Reynoldszahlen überwiegen die Reibungskräfte die Trägheitskräfte um mehrere Größenordnungen. Das bedeutet, dass bei der Bewegung des ziliären Stroms Trägheitskräfte praktisch keine Rolle mehr spielen. Man spricht von sog. *schleichenden Bewegungen* (*Stokes flow*).

Die berechneten Reynoldszahlen liegen deutlich unterhalb der von der Strömungsmechanik definierten kritischen Reynoldszahl von etwa 2300, oberhalb derer die Strömung turbulent ist. Deshalb liegt hier eine sog. *laminare Strömung* vor (eine geschichtete Strömung ohne jegliche Verwirbelung).

Mit dem *Gesetz von Stokes* lässt sich bei gegebener Viskosität  $\eta$  einer Flüssigkeit die Reibungskraft, die auf eine bewegte Kugel mit dem Radius  $r$  in dieser Flüssigkeit wirkt, berech-

nen (Fakultät für Physik, Georg-August-Universität Göttingen, 2011). Da die Reibungskraft gleich der Differenz aus Gewichtskraft und Auftriebskraft ist, kann man daraus die Sinkgeschwindigkeit  $v_{sink}$  der Kugel bzw. des Partikels berechnen (*Stokessche Gleichung*):

$$v_{sink} = \frac{2r^2 g (\rho_p - \rho_f)}{9\eta} \quad (\text{A.2})$$

Dabei sind  $g$  die Erdbeschleunigung und  $\rho_p - \rho_f$  die Differenz der Dichten von Partikel und Flüssigkeit. Die Dichte der eingesetzten Dynabeads beträgt  $\rho_{\text{Dyna}} = 1500 \text{ kg/m}^3$ , die der Fluoresbrite  $\rho_{\text{Fluores}} = 1050 \text{ kg/m}^3$ . Mit Gleichung A.2 ergeben sich die Sinkgeschwindigkeiten von Dynabeads zu  $5,52 \mu\text{m/s}$  und die von Fluoresbrite zu  $1,09 \text{ nm/s}$ . Das bedeutet, dass die Erdanziehung im Vergleich zum zilliären Transport bei den Dynabeads durchaus eine Rolle spielt, bei den kleineren und leichteren Fluoresbrite aber zu vernachlässigen ist.

## B Primer für die qRT-PCR

Tabelle B.1: Primer für die qRT-PCR

Nukleotidsequenz		Quelle
18s-mRNA vorwärts	5' - AAA CGG CTA CCA CAT CCA AG	TIB MOLBIOL GmbH, Berlin
18s-mRNA rückwärts	5' - CCT CCA ATG GAT CCT CGT TA	TIB MOLBIOL GmbH
IL6-mRNA vorwärts	5' - AGT TGC CTT CTT GGG ACT GA	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
IL6-mRNA rückwärts	5' - TCC ACG ATT TCC CAG AGA AC	Eurofins MWG Operon
KC-mRNA vorwärts	5' - GCT GGG ATT CAC CTC AAG AA	TIB MOLBIOL GmbH
KC-mRNA rückwärts	5' - AGG TGC CAT CAG AGC AGT CT	TIB MOLBIOL GmbH
MIP-2-mRNA vorwärts	5' - AAG TTT GCC TTG ACC CTG AA	TIB MOLBIOL GmbH
MIP-2-mRNA rückwärts	5' - AGG CAC ATC AGG TAC GAT CC	TIB MOLBIOL GmbH
MCP-1-mRNA vorwärts	5' - AGG TCC CTG TCA TGC TTC TG	TIB MOLBIOL GmbH
MCP-1-mRNA rückwärts	5' - TCT GGA CCC ATT CCT TCT TG	TIB MOLBIOL GmbH
CXCL5-mRNA vorwärts	5' - GAA AGC TAA GCG GAA TGC AC	TIB MOLBIOL GmbH
CXCL5-mRNA rückwärts	5' - GGG ACA ATG GTT TCC CTT TT	TIB MOLBIOL GmbH

## C Verzeichnis der verwendeten Filme

Tabelle C.1: Verzeichnis der für die Abbildungen verwendeten Filme auf der DVD

Dateiname auf der DVD	Thema
Film 1 Abb. 3.1.avi	Transport von Polystyrenpartikeln
Film 2 Abb. 3.1.avi	Transport von Polystyrenpartikeln
Film 3 Abb. 3.1.avi	Transport von Polystyrenpartikeln
Film Abb. 3.2.avi	Transport von Polystyrenpartikeln in und außerhalb eines Mukusstücks
Film Abb. 3.7.avi	Direkter, diskontinuierlicher zilienvermittelter Transport von Polystyrenpartikeln
Film Abb. 3.8.avi	Grenzen des zilienvermittelten Transports
Film Abb. 3.9.avi	Transport von Polystyrenpartikeln und Bakterien ( <i>E. coli</i> und <i>S. epidermidis</i> ) trotz Entfernung von Mukus
Film Abb. 3.11.avi	An Zilien haftende Bakterien
Film Abb. 3.12.avi	Anheftungsverhalten von Fluoresbrite-Partikeln an murinem Trachealepithel
Film Abb. 3.13.avi	Transport eines Mukusfadens

## **D Erklärung**

Ich erkläre, die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe angefertigt und keine anderen als die in der Arbeit genannten personellen, technischen und sachlichen Hilfen oder Hilfsmittel benutzt zu haben. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, sind als solche kenntlich gemacht. Ich versichere weiterhin, nicht vorher oder gleichzeitig andernorts einen Zulassungsantrag gestellt oder die Dissertation vorgelegt zu haben. Desweiteren erkläre ich, mich noch nie einem anderen Promotionsverfahren unterzogen zu haben.

## E Danksagung

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. med. Peter König und Prof. Dr. med. Jan Rupp für die Überlassung des Themas und des Arbeitsplatzes. Außerdem danke ich für die gute Betreuung, den unermüdlichen Willen, das Beste aus mir und dem Thema herauszuholen und mir die Möglichkeit eröffnet zu haben, die Forschung auf diese Art und Weise kennenzulernen.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei der Universität zu Lübeck für die Förderung durch das Promotionsstipendium „Exzellenzmedizin“ der Universität zu Lübeck, durch das ich insbesondere finanziell während meiner Dissertation unterstützt wurde.

Danken möchte ich auch allen technischen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern aus dem Institut für Anatomie und dem Institut für Mikrobiologie und Hygiene. Davon möchte ich Kristin Wischnat, Angela Gravenhorst, Kathy Budler, Gudrun Knebel und Ursula Almert besonders hervorheben.

Desweiteren möchte ich mich bedanken für die unkomplizierte Hilfe bei der statistischen Auswertung durch Familie König, sowohl durch Prof. Dr. rer. biol. hum. Inke R. König als auch durch Prof. Dr. med. Peter König.

Meinem Vater, Prof. Dr.-Ing. Rainer Bermbach, möchte ich danken für die Unterstützung beim Erstellen des Layouts und einzelner Grafiken sowie bei der Handhabung von  $\LaTeX$ .

Dem Fachmann für Strömungsmechanik, Prof. Dr.-Ing. Falk Klinge, aus dem Institut für Konstruktion und angewandten Maschinenbau der Ostfalia Hochschule für angewandte Wissenschaften möchte ich danken für die Beratung bei der Auswertung der Strömungsbeobachtungen.

Für die fachliche, mentale, psychische und koffeinhaltige Unterstützung sowie eine unvergessliche Zeit möchte ich mich vor allem bei Kristin, Karina, Ina, Sarah, Mario und den Vielen, die ich hier nicht alle namentlich aufführen kann, bedanken.

Meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, Dr. phil. Christhild Radloff-Bermbach und Prof. Dr.-Ing. Rainer Bermbach, gebührt unermesslicher Dank. Ohne ihre unermüdliche Unterstützung und Hilfe praktischer, mentaler und psychologischer Natur läge die Arbeit nicht in dieser Form vor. Insbesondere in Zeiten sich noch entwickelnder Frustrationstoleranz konnten ihr mir immer wieder vor Augen führen, wie begeistert ich eigentlich wirklich von meinem Thema bin. Danke!

## **F Lebenslauf**

Auf die Veröffentlichung des Lebenslaufs wird in der elektronischen Dissertation verzichtet.

## G Eigene Arbeiten

Bermbach S, Weinhold K, Roeder T, Petersen F, Kugler C, Goldmann T, Rupp J, König P: Mechanisms of cilia-driven transport in the airways in the absence of mucus. *Am J Respir Cell Mol Biol* 51, 56-67 (2014)

Zehethofer N, Bermbach S, Hagner S, Garn H, Müller J, Goldmann T, Lindner B, Schwudke D, König P: Lipid Analysis of Airway Epithelial Cells for Studying Respiratory Diseases. *Chromatographia*, 1-11 (2014)

Bermbach S, Rupp J, König P: Transport of bacteria and cell-type specific induction of signaling in the tracheal airway epithelium of mice. Poster 28. Arbeitstagung Anatomische Gesellschaft, Würzburg, 2011

Döring K, Bermbach S, Weinhold K, Lindner B, Rupp J und König P: Eine einfache Methode zur Analyse der mRNA-, Protein- und Lipid-Zusammensetzung aus dem Trachealepithel der Maus. Herbsttreffen DGP Sektion Zellbiologie, Berlin, 2010

Döring K, Bermbach S, Weinhold K, Lindner B, Rupp J und König P: A simple method to analyze mRNA and lipid content of murine tracheal epithelium. Poster 27. Arbeitstagung Anatomische Gesellschaft Würzburg, 2010

Bermbach S, König P und Rupp J: Erste Schritte eines Bakteriums in den Atemwegen. Poster Uni im Dialog, Lübeck, 2009

König P, Bermbach S, Schiemann F, Petersen F, Rupp J: Cilia-driven transport of particles and bacteria in the airways is preserved in the absence of mucus and control of periciliary fluid volume. 104th International Meeting of the Anatomische Gesellschaft, Antwerpen, 2009

König P und Bermbach S: Mukus und exakte Kontrolle der Menge der periziliären Flüssigkeit sind keine Voraussetzung für den zilienvermittelten Transport in den Atemwegen. Poster Herbsttreffen DGP Sektion Zellbiologie, Freiburg, 2008