

# Der Einfluss von Tumornekrosefaktor- $\alpha$ auf den ziliären Transport in der Trachea der Maus

---

Dagmar Schulte

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



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

**Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2015

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1<sup>st</sup> Edition 2015

© 2015 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

**Der Einfluss von Tumornekrosefaktor- $\alpha$  auf den  
ziliären Transport in der Trachea der Maus**

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

vorgelegt von

**Dagmar Schulte**

aus Münster

Gießen 2014

Aus dem Zentrum für Chirurgie, Anästhesiologie und Urologie,  
Klinik für Anästhesiologie, Operative Intensivmedizin und Schmerztherapie  
der Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen,  
Direktor: Prof. Dr. med. Markus A. Weigand

Betreuer: Prof. Dr. Dr. M. Henrich

2. Gutachter: Prof. Dr. L. Schmitz

Tag der Disputation: 27.01.2015

# Inhaltsverzeichnis

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| <b>1</b>   | <b>Einleitung .....</b>   | <b>1</b>  |
| <b>1.1</b> | <b>Das Flimmerepithel der unteren Atemwege .....</b>  | <b>1</b>  |
| 1.1.1      | Aufbau des Flimmerepithels.....   | 1         |
| 1.1.2      | Funktion der Kinozilien.....  | 3         |
| 1.1.3      | Funktion des Flimmerepithels .....  | 4         |
| 1.1.4      | Regulation der ziliären Tätigkeit des Flimmerepithels .....                                   | 5         |
| 1.1.5      | Einfluss des Immunsystems auf die ziliäre Tätigkeit.....                                      | 7         |
| 1.1.6      | Ziliäre Tätigkeit unter pathophysiologischen Bedingungen.....                                 | 8         |
| <b>1.2</b> | <b>Die Rolle von TNF-<math>\alpha</math> im Organismus .....</b>                              | <b>10</b> |
| 1.2.1      | Struktur von TNF- $\alpha$ .....  | 10        |
| 1.2.2      | Funktion von TNF- $\alpha$ .....  | 10        |
| 1.2.3      | TNF-Rezeptoren.....   | 13        |
| <b>1.3</b> | <b>Fragestellung .....</b>  | <b>14</b> |
| <b>2</b>   | <b>Material und Methoden.....</b>   | <b>15</b> |
| <b>2.1</b> | <b>Die Tracheapräparation der adulten Maus .....</b>  | <b>15</b> |
| <b>2.2</b> | <b>Die Messung der Partikeltransportgeschwindigkeit und<br/>der Zilienschlagfrequenz.....</b> | <b>18</b> |
| 2.2.1      | Vorbereitung des Delta T Kulturschälchens .....   | 18        |
| 2.2.2      | Vorbereitung des Messstandes.....   | 18        |
| 2.2.3      | Messung der Partikeltransportgeschwindigkeit .....  | 19        |
| 2.2.4      | Messung der Zilienschlagfrequenz .....  | 20        |
| 2.2.5      | Versuchsprotokolle.....   | 21        |
| 2.2.6      | Offline Datenauswertung.....  | 23        |
| <b>2.3</b> | <b>Der Nachweis von TNF-Rezeptoren anhand der<br/>Expression von mRNA .....</b>               | <b>24</b> |
| 2.3.1      | RNA-Isolierung und Transkription.....   | 24        |
| 2.3.2      | Polymerasekettenreaktion.....   | 26        |
| 2.3.3      | Quantitative Polymerasekettenreaktion .....   | 27        |
| 2.3.4      | Durchführung der Gelelektrophorese.....   | 28        |

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| <b>2.4</b> | <b>Statistik .....</b>   | <b>29</b> |
| <b>3</b>   | <b>Ergebnisse.....</b>   | <b>30</b> |
| <b>3.1</b> | <b>Die Überprüfung der ziliären Tätigkeit unter<br/>Exposition von TNF-<math>\alpha</math> .....</b>                         | <b>30</b> |
| 3.1.1      | Partikeltransportgeschwindigkeit unter Exposition von TNF- $\alpha$ .....  | 30        |
| 3.1.2      | Zilienschlagfrequenz unter Exposition von TNF- $\alpha$ .....  | 33        |
| 3.1.3      | Expression von TNF-Rezeptoren.....   | 34        |
| 3.1.4      | Partikeltransportgeschwindigkeit unter Inhibition des TNF-Rezeptors<br>1 .....   | 37        |
| 3.1.5      | Zilienschlagfrequenz von TNF-R1 <sup>-/-</sup> -und B16J Mäusen unter<br>Exposition von TNF- $\alpha$ .....                  | 39        |
| <b>3.2</b> | <b>Die Überprüfung von Transduktionskaskaden unter<br/>Exposition von TNF-<math>\alpha</math> .....</b>                      | <b>42</b> |
| 3.2.1      | Partikeltransportgeschwindigkeit unter Inhibition der NO-Synthasen .   | 42        |
| 3.2.2      | Partikeltransportgeschwindigkeit unter Inhibition der muskarinergen<br>Rezeptoren.....                                       | 45        |
| 3.2.3      | Partikeltransportgeschwindigkeit unter Inhibition von<br>Serotoninrezeptoren.....  | 46        |
| <b>4</b>   | <b>Diskussion.....</b>   | <b>49</b> |
| <b>4.1</b> | <b>Der Einfluss von TNF-<math>\alpha</math> auf das Flimmerepithel der<br/>Trachea der adulten Maus .....</b>                | <b>49</b> |
| <b>4.2</b> | <b>Die Beteiligung anderer Signalwege an der Regulation<br/>der ziliären Tätigkeit in der Trachea der adulten Maus .....</b> | <b>54</b> |
| <b>4.3</b> | <b>Konklusion.....</b>   | <b>59</b> |
| <b>5</b>   | <b>Zusammenfassung .....</b>   | <b>60</b> |
| <b>6</b>   | <b>Summary .....</b>   | <b>61</b> |
| <b>7</b>   | <b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>   | <b>62</b> |
| <b>8</b>   | <b>Abbildungsverzeichnis .....</b>   | <b>64</b> |
| <b>9</b>   | <b>Tabellenverzeichnis .....</b>   | <b>65</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>10 Literaturverzeichnis .....</b>    | <b>66</b> |
| <b>11 Publikationsverzeichnis.....</b>  | <b>75</b> |
| <b>12 Ehrenwörtliche Erklärung.....</b> | <b>76</b> |
| <b>13 Danksagung.....</b>               | <b>77</b> |
| <b>14 Lebenslauf .....</b>              | <b>78</b> |





# 1 Einleitung

## 1.1 Das Flimmerepithel der unteren Atemwege

Die Atemwege stehen im direkten Kontakt zur Umwelt. Um ein Eindringen von pathologischen Organismen von vornherein zu verhindern, besitzen die Atemwege als erste Abwehrlinie neben einer eng verzahnten Epithelschicht auch Mechanismen zur mechanischen Beseitigung der Krankheitserreger. Hierzu gehört das Flimmerepithel der Trachea.

Das Flimmerepithel kleidet als mehrreihiges, hochprismatisches Epithel die Innenfläche der Trachea und die Bronchien aus. An seiner Oberfläche ist das Flimmerepithel von einer Flüssigkeit aufgelagert, die aus zwei Schichten besteht: einer periziliären Flüssigkeitsschicht (Solphase), die nahe der Zelloberfläche aufliegt und einer Mukusschicht (oder Gelphase), die oberhalb der Solphase liegt (121) (s. Abbildung 1).

### 1.1.1 Aufbau des Flimmerepithels

Im Flimmerepithel wurden bisher mindestens zwölf unterschiedliche Zelltypen beschrieben. Die sechs wichtigsten sind die Basalzellen, die zilientragenden Zellen, die sekretorischen Zellen, die Bürstenzelle, die Becherzelle und die neuroendokrine Zelle (37, 76). Alle Zellen des Flimmerpithels sind auf der Basalmembran verankert (76).

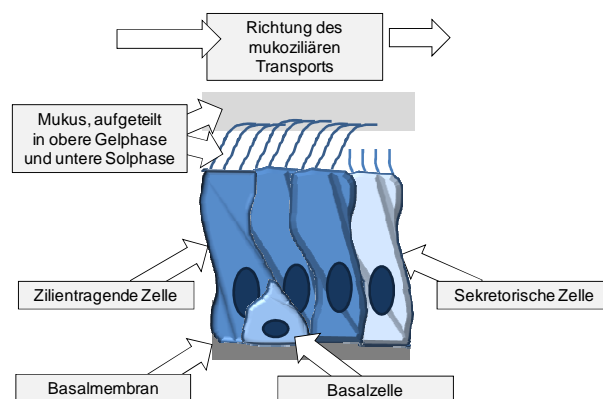


Abbildung 1: Aufbau des Flimmerepithels in den Atemwegen  
Seitliche Ansicht des mehrreihigen Epithels mit zilientragenden Zellen, sekretorischer Zelle und Basalzelle. Die Zilien schlagen in der Solphase des Mukus und transportieren somit die Gelphase mit den abzutragenden Partikel Richtung Kehlkopf (76, 121).

Die zilientragende Zelle ist der häufigste Zelltyp in der Trachea, gefolgt von der sekretorischen Zelle und der Basalzelle (s. Abbildung 1). Die anderen Zellentypen treten selten auf. In Abbildung 1 werden nur die drei erstgenannten Zellen dargestellt. In das tracheale Lumen hinein ragen die Zilien der zilientragenden Zellen und die wenigen Mikrovilli der sekretorischen Zelle. Die Zilien sind circa 6  $\mu\text{m}$  lang (38, 76, 82).

Eine Zilie ist eine längliche Zellstruktur, die der Zellmembran entspringt. Longitudinal angeordnete Mikrotubuli bilden das Zytoskelett, das sogenannte ziliäre Axonem. Die Mikrotubuli entspringen dem am unteren Pol der Zilie lokalisierten Basalkörperchen. Die Basalkörperchen besitzen ein Füßchen, das mit dem spitzen Ende in Richtung des effektiven Schlags der Zilie zeigt. Alle Basalkörperchen und deren Füßchen sind in eine Richtung orientiert, damit die Zilien der Zelle in eine gemeinsame Richtung schlagen (90). Wenn man eine Zilie im Querschnitt betrachtet, wird ein zentrales Paar von neun doppelt angeordneten Mikrotubuli umringt. Diese Anordnung erinnert an eine Radspeiche und wird als 9+2 Struktur bezeichnet. Die Mikrotubuli sind Heterodimere, die - außer aus  $\alpha$ & $\beta$ -Tubulin und Dynein - aus über 200 Proteinen zusammengesetzt sind. Entlang der Mikrotubuli ist das Dynein als äußere und innere Dyneinarme aneinandergereiht (88) (s. Abbildung 2).

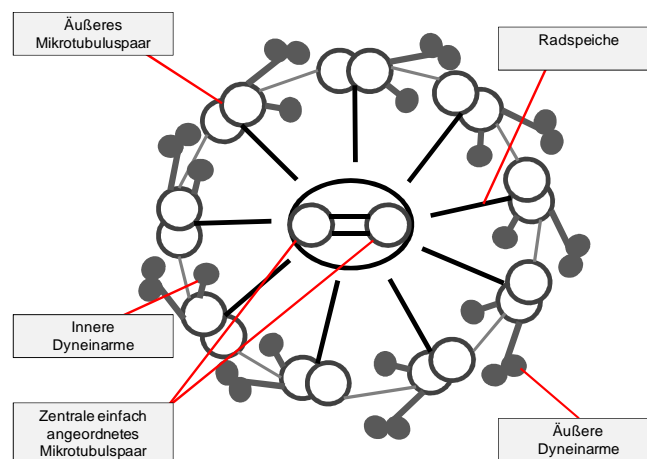


Abbildung 2: Schematische Zeichnung der sogenannten Radspeichenstruktur einer Zilie im Querschnitt

Außen liegen die A und B Tubuli (äußeres Mikrotubuluspaar). Sie umringen ein zentrales innen liegendes Paar (zentrales einfach angeordnetes Mikrotubuluspaar). Dies wird als 9+2 Struktur der Mikrotubuli bezeichnet. An die äußeren Mikrotubuli sind die inneren und äußeren Dyneinarme und die Radspeiche angegliedert (88).

Die Zellmembran, die das Zytoskelett umgibt, unterscheidet sich insofern vom Rest der Zellmembran der Zelle, als dass sie spezifische Proteine enthält. Einige wissenschaftliche Arbeiten stellen die Hypothese auf, dass eine selektive Barriere an der Zilie die Proteine sortiert, bevor sie in die Zellmembran der Zilie integriert werden (89). Diese Barriere wird als *Halsband* bezeichnet. Es ist an der Zilienwurzel lokalisiert und enthält reichlich Centrin, ein Calcium bindendes Protein (121). Das Halsband scheint eine wichtige Rolle in der Zilie zu spielen. Bei Infektionen des Trachealepithels mit *Bordetella pertussis* und Mycoplasmen wurde beobachtet, dass kurz vor dem Zelltod der zilientragenden Zellen das Halsband zerstört oder ganz verschwunden war (89).

Die ziliäre Krone an der Zilienspitze ist ein spezieller Transmembrankomplex. Die 9 Mikrotubulipaare laufen dort zu einer Faser aus, die an einer zytoplasmatischen Scheibe anhaftet. Dieser Komplex bildet die Krone, die drei bis sieben sogenannte *Krallen* trägt. Die Krallen greifen mechanisch während des effektiven Schlags in die darüberliegende Mukusschicht (88, 89, 91).

### **1.1.2 Funktion der Kinozilien**

Zilien schlagen spontan und kontinuierlich durchschnittlich mit einer Frequenz von 13,6 Hz (31). Die Zilien ruhen in einer „hands-down“-Position. Der Schlag der Zilien beginnt mit einer Rückholbewegung. Die Zilie beugt sich von unten angefangen weiter nach oben. Während dieser Bewegung wird sie im Uhrzeigersinn in einem großen Bogen nach hinten und zur Seite gezogen bis sie 180° gegenüber ihrer Startposition steht. Von dieser Position aus schlägt die Zilie in einer geraden und senkrechten Bewegung vorwärts. Dieser effektive Schlag beschreibt einen 110° weiten Bogen, dann ruht die Zilie, um danach wieder mit der Rückholbewegung in den Schlagzyklus einzutreten. Der Bewegungsablauf des Zilienschlags kann am besten als Zyklus beschrieben werden. Abbildung 3 verdeutlicht diesen Bewegungsablauf schematisch (121).

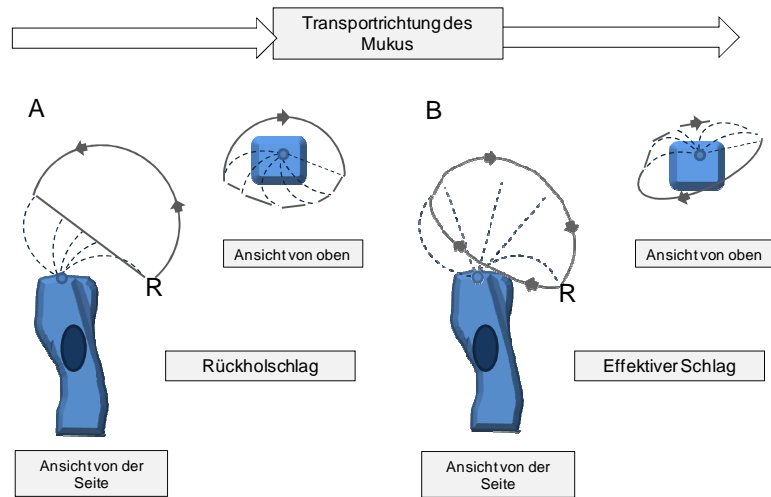


Abbildung 3: Ablauf der Zilienschlagbewegung

Die Zilie macht im Rückholschlag (A) einen großen Bogen, so dass die Spitze der Zilie gegenüber der Ruheposition liegt. Im effektiven Schlag (B) bewegt sie sich im Halbkreis wieder Richtung Ruheposition. Der Mukus wird dabei in Richtung des effektiven Schlages transportiert. Der Ablauf des Rückhol- und des effektiven Schlages sind jeweils einmal in der seitlichen Ansicht und der Ansicht von oben der zilientragenden Zelle zu sehen (R = Ruheposition der Zilie). Modifiziert nach Wanner et al. (121).

Innerhalb der Zilien gleiten die neun äußeren Paare der Mikrotubuli während des Zilienschlages aneinander (91). Die oben beschriebenen Dyneinarme arbeiten dabei zusammen. Die äußeren Dyneinarme regeln während des Schlagzyklus die Schlagfrequenz und die inneren Dyneinarme die Schlagform (60). Dynein ist gleichzeitig eine Adenosintriphosphatase, welche für diesen energieaufwendigen Prozess Adenosintriphosphat (ATP) hydrolysiert. Aus diesem Grund liegen unterhalb der Zilie viele Mitochondrien (37). Die Mitochondrien produzieren ATP, das als Substrat für diesen Prozess dient.

### 1.1.3 Funktion des Flimmerepithels

Der physiologische Hustenstoß allein reicht meistens nicht aus, um die Atemwege von Partikeln zu reinigen (121). Das Flimmerepithel unterstützt die Reinigung der Atemwege durch eine koordinierte Zilientätigkeit ihrer zilientragenden Zellen und die Produktion des Mukus durch die Becherzellen. Diese Funktion des Flimmerepithels wird als mukoziliäre Clearance beschrieben. Sie ist eine Barriere gegenüber Partikeln, Mikroorganismen und Noxen.

Während der Inspiration gelangen Partikel auf den Mukus des Flimmerepithels und werden anschließend mit der Zilientätigkeit Richtung Kehlkopf transportiert (117).

Dort werden sie mit dem Mukus abgehustet und geschluckt oder expektoriert. Dieser Mukus besitzt antioxidative, antimikrobielle und antiproteatische Eigenschaften, die eine chemische Barriere gegen eindringende Pathogene bildet. Weiterhin befinden sich im Mukus mobile Immunzellen. Diese Zellen agieren als biologische Barriere gegen Pathogene. Durch diese Barrieren hindert die mukoziliäre Clearance das Anheften von Mikroorganismen am Flimmerepithel und schützt so vor deren Eindringen in den Körper (55).

Laut Knowles und Boucher (2002) sind die Zilienschlagfrequenz (ZSF) und die viskoelastischen Eigenschaften des Mukus ausschlaggebende Faktoren für eine optimale mukoziliäre Clearance (55). Dementsprechend sezerniert das Epithel verschiedene Glykoproteine, um beispielweise die Viskosität des Mukus zu erhöhen. Die Viskosität trägt dazu bei, dass die Partikel auf dem Mukus haften bleiben.

Die Zellen des Oberflächenepithels bilden untereinander enge Zell-Zell Kontakte mittels Adhäsionskomplexen wie tight junctions. Dieser enge Kontakt erlaubt dem Atemwegsepithel, eine Polarität zwischen dem Lumen und der Serosa aufzubauen (10, 71). Diese Polarität dient wiederum der Absorption und Sezernierung von Ionen und Flüssigkeit. Sie ist für einen korrekten Aufbau des Mukus und der Solphase wichtig, so dass darin die Zilien effektiv schlagen können (82). Bekanntermaßen führt eine Beeinträchtigung dieser Faktoren, und somit auch der mukoziliären Clearance, vermehrt zu bronchopulmonalen Infekten und anderen Atemwegserkrankungen (121). Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf die ziliäre Komponente der mukoziliären Clearance, da der ziliäre Transport die Schlüsselfunktion zur Verteidigung gegen eindringende Pathogene innehat.

### **1.1.4 Regulation der ziliären Tätigkeit des Flimmerepithels**

Die ziliäre Tätigkeit kann von Faktoren wie *pH-Wert*, *Temperatur*, *Luftfeuchtigkeit*, *mechanischen Stimuli* und durch *Pharmaka* beeinflusst werden (99). In der Literatur sind bereits viele Substanzen hinsichtlich ihres Effekts auf das Flimmerepithel untersucht worden (121). Es hat sich herausgestellt, dass fast alle Agonisten des autonomen Nervensystems die ZSF stimulieren. Beispielsweise konnte am Flimmerepithel von Schafstracheen gezeigt werden, dass *Acetylcholin* die ZSF erhöht. Dieser Effekt konnte durch eine vorherige Inkubation mit *Atropin* unterdrückt werden (87). Klein et al. (2009) untersuchten diesen Effekt in

Abhängigkeit der muskarinergen Rezeptorsubtypen in der Trachea der Maus. Sie exponierten die explantierten Tracheen im Organbad von jeweils M1-M5 defizienten Mäusen mit Muskarin und ermittelten die ZSF. Aus den Versuchen lässt sich schließen, dass der M3-Subtyp des muskarinergen Rezeptors die ZSF stimuliert und der M2-Subtyp die ZSF inhibiert. Auch in dieser Studie stimulierte Acetylcholin die ZSF des Trachealepithels und Atropin inhibierte diesen Effekt (53). Leider kann dadurch nicht eindeutig auf eine Beteiligung des Nervus vagus (N. vagus) geschlossen werden. Bei Versuchen mit Hunden stimulierte inhalatorisch verabreichtes Acetylcholin die mukoziliäre Clearance. Wenn jedoch der N. vagus stimuliert wurde, war dieser Effekt nicht zu beobachten (120, 121). Wie diese Effekte intrazellulär vermittelt werden, ist noch nicht vollständig erforscht. Es gibt Hinweise, dass speziesspezifische Unterschiede bei der Aktivierung und Inhibition des N. vagus bestehen. In früheren Arbeiten wurden die Signalkaskaden des zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP) und des zyklischen Guanosinmonophosphat (cGMP) in Zusammenhang mit ihren Aktivatoren NO und Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) am Flimmerepithel des Rindes untersucht (64). Wyatt et al. hatten 2005 am isolierten Axonem des Trachealepithels von Rindern gezeigt, dass die ZSF von cAMP und cGMP abhängig ist (126). Insbesondere  $\beta$ -adrenerge Pharmaka aktivieren Adenylatcyclasen, die intrazellulär aus ATP cAMP synthetisieren und folglich die ZSF erhöhen. (91, 104). Wyatt et al. vermuten, dass Proteinkinasen A & G (PKA und PKG), die cAMP sowie cGMP abhängig sind, dabei eine Rolle spielen (126). So wurde in einer früheren Studie dieser Arbeitsgruppe gezeigt, dass *Ethanol* die ZSF über die PKA aktiviert. Interessanterweise konnte die Aktivierung der ZSF nicht nur von PKA-Inhibitoren sondern auch von NO-Synthasehemmern unterdrückt werden (96).

An isolierten Rinderepithelzellen scheint *Stickstoffmonoxid* (NO) die ZSF durch Zytokine zu stimulieren. Die Zytokin vermittelte Erhöhung der ZSF kann durch NO-Synthasehemmer inhibiert werden (48). Auch andere Studien deuten darauf hin, dass NO in der Regulation der ZSF eine Rolle spielt (49, 50). In weiteren Studien konnte die ZSF mittels NO-Synthasehemmern gesenkt und durch Applikation von NO-Donatoren angehoben werden (47). Weiterhin konnte das Vorhandensein von *endothelialer NO-Synthase* am Axonem im Rinderepithel bestätigt werden (105). Nicht nur im Rinderepithel sind NO-Synthasen vorhanden, sondern auch im Trachealepithel der Ratte konnte die endotheliale NO-Synthase nachgewiesen werden (58, 127). Im Gegensatz dazu konnte an Epithelzellen von Schafstracheen

nicht bestätigt werden, dass die ZSF über NO reguliert wird (86). Die speziesspezifischen Unterschiede der Regulation der ZSF deuten daraufhin, dass die ZSF zwischen den Spezien über unterschiedliche Signalkaskaden reguliert werden kann.

### **1.1.5 Einfluss des Immunsystems auf die ziliäre Tätigkeit**

Wie bei allen Oberflächen, die im direkten Kontakt mit der Umwelt stehen, sind auch in den Atemwegen verschiedene *Zellen des Immunsystems* präsent. In den Alveolen zum Beispiel existieren Makrophagen, die sie von Partikeln und Krankheitserregern reinigen. In den Atemwegen sind Makrophagen zu finden, aber auch Mastzellen und Granulozyten. Diese Zellen können Substanzen freisetzen, die die ZSF beeinflussen. Die freigesetzten Substanzen, zum Beispiel Oxidantien, Proteasen (wie Kollagenase) oder andere bioaktive Moleküle, können die Zilien schädigen. Im Entzündungsprozess beschädigte Granulozyten reduzieren mittels major basic protein die ZSF. Die beschädigten Zilien schlagen dann langsamer und unkoordinierter, somit wird die mukoziliäre Clearance der Atemwege reduziert (6, 121).

Bei anaphylaktischen Reaktionen können Immunzellen Proteine freisetzen, die die Beweglichkeit der Zilien reduzieren. Hier sind Mastzellen, basophile Granulozyten und Thrombozyten zu nennen, die bei einer allergischen Reaktion Histamin und Leukotriene freisetzen und so die Beweglichkeit beeinflussen. In vitro kann zwar durch Histamin kein Effekt auf die Zilientätigkeit provoziert werden, aber in vivo erhöht es die Geschwindigkeit der mukoziliären Clearance beim Menschen (73).

Während der Entzündungsreaktion wird das Atemwegsepithel aktiviert. Es kann über Mediatoren wie Interleukin-1 (IL-1) direkt mit den Zellen des Immunsystems interagieren (6). Der Entzündungsprozess in den Atemwegen ist jedoch ein komplexer Vorgang. Die Epithelzellen fördern die Immunantwort, indem sie Adhäsionsmoleküle für Leukozyten und Lymphozyten exprimieren, Antigene präsentieren und die Immunzellen vor dem programmierten Zelltod (Apoptose) schützen (6, 85). Alveoläre Makrophagen erhalten anschließend über Stimulation mit TNF- $\alpha$  und IL-1 die initiale Immunantwort der Epithelzellen weiter aufrecht (12, 110, 115). Dass das Atemwegsepithel zu einer direkten Immunantwort in der Lage ist, zeigten Mio et al. anhand von Zellkulturen. Atemwegsepithelzellen setzten als

Antwort auf Stimulation mit TNF- $\alpha$  Interleukin-8 (IL-8) frei. TNF- $\alpha$  ist ein proinflammatorisches Zytokin und IL-8 ein wichtiger Botenstoff des Immunsystems. Dies lässt eine Zytokin vermittelte aktive Kommunikation zwischen Atemwegsepithel und Immunzellen vermuten (70).

### 1.1.6 Ziliäre Tätigkeit unter pathophysiologischen Bedingungen

Die Zilien des Atemwegsepithels ermöglichen die mukoziliäre Clearance und bilden einen wichtigen Teil des Verteidigungsmechanismus des Respirationstrakts (35). Wenn die Zilientätigkeit aufgrund primärer oder sekundärer Ursachen beeinträchtigt ist, kommt es zum Erliegen der mukoziliären Clearance. Dies kann dadurch bedingt sein, dass das Zilium selbst beschädigt ist oder dass eine pathologisch veränderte Mukusviskosität das effektive Schlagen der Zilie verhindert (60). Die Atemwege sind gegenüber Erreger angreifbarer, es kommt vermehrt zu Infektionen, in deren Endstadium sich Bronchiektasien ausbilden (15, 34, 35).

Zu den primären Ursachen zählen genetisch bedingte Erkrankungen, wie zum Beispiel die *primäre ziliäre Dyskinesie* oder die *zystische Fibrose (CF)*. Bei der primären ziliären Dyskinesie liegen eine Veränderung der Dyneinarme, Radspeichendefekte oder das Fehlen des zentralen Doppeltubulusapparates vor. Insofern sich diese Zilien bewegen können, schlagen sie ineffektiv. Wenn die primäre ziliäre Dyskinesie mit einem *Situs inversus* auftritt, wird es *Kartagener Syndrom* genannt (46, 97-99). Bei bestehender reduzierter mukoziliärer Clearance zeigen diese Patienten klinisch eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber bronchopulmonalen Infekten und Bronchiektasien (62). Im Gegensatz dazu weisen Patienten mit zystischer Fibrose keine ultrastrukturelle Veränderung der zilientragenden Zellen in den Atemwegen auf (57). Vielmehr führt die CF aufgrund einer Mutation im Gen für einen Chlorid-Kanal, den *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*, zu einer erhöhten Viskosität des Mukus (83, 114). Die Patienten, die an diesem Syndrom leiden, haben eine reduzierte mukoziliäre Clearance, weil die Zilien im viel zu viskösen Mukus in ihrer Schlagbewegung behindert sind (11). Es ist allgemein bekannt, dass bei Patienten mit CF die bronchopulmonalen Infekte zeitlebens die therapeutische Problematik darstellen.

Sekundäre Ursachen für eine Beeinträchtigung der ziliären Tätigkeit sind *Infektionen*, *Allergien* sowie *mechanische* und *toxische Traumata* und



*Tumorerkrankungen* (60). Zum Beispiel zeigte eine Studie, dass die Zilien von Rauchern viel kürzer sind als die von gesunden Nichtrauchern (63). Mechanische Traumata können zum Beispiel die invasive Beatmung sein. Die invasive Beatmung erleichtert durch die Reduktion der Abwehrmechanismen des Atemwegsepithels Bakterien, das Atemwegsepithel zu schädigen und *Ventilator-assoziierte Pneumonien* zu verursachen (17). Auch Erkrankungen der Atemwege wie *chronisch obstruktive Bronchitis* und *Asthmabronchiale* schädigen das Flimmerepithel (15, 34). Die sekundären Ursachen bewirken dabei in unterschiedlichem Ausmaß eine Beschädigung der Axoneme und funktionsuntüchtige Zilien (60).

Das Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* kann die Atemwege infizieren, insbesondere bei Patienten mit CF (55). Der Mukus von Patienten mit CF verbleibt aufgrund der hohen Viskosität länger in den Atemwegen. Dadurch kann *Pseudomonas aeruginosa* das Epithel leichter besiedeln, da die vom Epithel produzierten antimikrobiellen Substanzen das Wachstum von Bakterien für nur 2 bis 6 Stunden hemmen können (21, 125). Wenn bis dahin nicht die Atemwege vom Mukus gereinigt sind, können die Bakterien wieder weiter wachsen. Das ist bei Patienten mit CF der Fall. *Pseudomonas aeruginosa* heftet sich dabei an die Zilien der Atemwegsepithelzellen und hemmt die ziliäre Tätigkeit (41, 42). Es interagiert mit der *Glykokalix* der Epithelzellen über *Lektine* (Kohlenhydrat bindende Proteine) (36, 128). Weiterhin produzieren Pseudomonaden die Proteasen *Elastase* und *Alkaline Protease*, die die Mikrotubuli der Zilien schädigen können (40). Das alles kann zu einer chronischen Infektion der Atemwege mit *Pseudomonas aeruginosa* führen.

Die Ursache von Keuchhusten, einer Atemwegserkrankung, ist *Bordetella pertussis*. Die Bakterien haften an den Zilien des Flimmerepithels und vermehren sich dort. Sie verursachen eine Hypersekretion des Mukus und schädigen weiter das Epithel, was für das Krankheitsbild verantwortlich ist (101).

Andere Pathogene, die die ziliäre Tätigkeit beeinflussen, sind zum Beispiel *Streptococcus pneumoniae* (103) oder *Haemophilus influenza* (5). Auch wurde in murinen Tracheen beobachtet, dass bei simultaner Infektion mit *Influenzaviren* und *Pseudomonas aeruginosa* die ZSF reduziert wird (81).

## 1.2 Die Rolle von TNF- $\alpha$ im Organismus

### 1.2.1 Struktur von TNF- $\alpha$

TNF- $\alpha$  ist ein *Zytokin* (Signalstoff) mit vielfältigen Funktionen. Er gehört zu der *TNF/TNFR-Superfamilie* (Ligand/Rezeptor-Superfamilie) und spielt nach bisherigem Kenntnisstand die zentrale Rolle in der Vermittlung der Immunantwort in Säugetieren (66). Zu dieser Superfamilie gehört auch *Lymphotoxin- $\alpha$* , das ähnliche Funktionen wie TNF- $\alpha$  besitzt (79). Mitglieder der TNF-Superfamilie sind neben TNF- $\alpha$  auch *Typ II Transmembranproteine*. Sie bilden als Vorstufe ein *Trimer* (Dreiergruppe) mit einem intrazellulären N-Terminus. Die Vorstufe des Trimers wird auf der Zelloberfläche exprimiert (14). Diese wird mittels einer Metalloprotease abgespalten, danach liegt die lösliche Form des Proteins vor. Die Metalloprotease *TNF- $\alpha$  Converting Enzyme* (TACE) spaltet TNF- $\alpha$  in die lösliche Form (sTNF- $\alpha$ ) bestehend aus drei 17 kDa großen Untereinheiten (9, 25).

TNF- $\alpha$  wurde 1975 in Versuchen zur hämorrhagischen Nekrose von Tumoren basierend auf bakteriellem Endotoxin in Zellkulturen entdeckt. Er wurde als Substanz beschrieben, die die gleiche letale Wirkung auf Tumoren hat wie Endotoxin, aber von den Wirtszellen produziert wird. Diese Substanz bekam dort den Namen Tumornekrosefaktor (16). Das Gen von TNF- $\alpha$  konnte 1985 zum ersten Mal sequenziert werden (78). Nach der Sequenzierung stellte sich heraus, dass auch andere Zytokine, die man bis dahin Cachectin und Differentiation-inducing Faktor genannt hatte, mit TNF- $\alpha$  identisch sind (26, 39).

TNF- $\alpha$  wird hauptsächlich von aktivierten *Makrophagen* produziert, aber auch von Monozyten, Lymphozyten, natürlichen Killerzellen, Endothelzellen und glomerulären Zellen. In der Literatur ist weiterhin beschrieben, dass mittels In-situ-Hybridisierung TNF- $\alpha$  in Mastzellen nachgewiesen werden konnte (102). Auch schütteten murine Flimmerepithelzellen TNF- $\alpha$  aus, wenn es vorher mit dem Influenza A-Virus infiziert wurde (75).

### 1.2.2 Funktion von TNF- $\alpha$

TNF- $\alpha$  ist neben IL-1 und IL-6 das proinflammatorische Zytokin im Entzündungsprozess. Die Produktion von TNF- $\alpha$  wird hauptsächlich vom bakteriellen *Lipopolysaccharide* (LPS, Endotoxin) getriggert und von

Glukokortikoidenunterdrückt (8). TNF- $\alpha$  wirkt dabei chemotaktisch auf Lymphozyten, Monozyten und polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN). Er stimuliert Phagozytose, Adhärenz an Endothel und Produktion von Superoxiden der Immunzellen. TNF- $\alpha$  verursacht, dass Endothelzellen Proteine außerhalb ihrer eigentlichen Funktion produzieren und sich strukturell reorganisieren, so dass die Endothelschicht durchlässig wird (capillary leakage). TNF- $\alpha$  macht das Endothel auch empfindlicher gegenüber Verletzungen durch Leukozyten. Er stimuliert beispielsweise Endothelzellen IL-8 zu synthetisieren und auszuschütten. Dadurch werden PMN angelockt, die dann degranulieren und das Endothel wiederum schädigen (95) (s. Abbildung 4). Wenn es im Verlaufe einer unkontrollierbaren Infektion zur systemischen Immunantwort (*systemic inflammatory response syndrom/SIRS*) kommt, wird TNF- $\alpha$  systemisch abgegeben. Daraus resultiert ein endotoxischer bzw. *septischer Schock*. TNF- $\alpha$  ist dabei maßgeblich an der Pathogenese des septischen Schocks beteiligt: Wenn man gesunden Probanden Endotoxin injiziert, entwickeln diese Symptome wie Fieber, Myalgie, Übelkeit und Kopfschmerzen. Diese Symptome korrelieren mit einem erhöhten Serumspiegel von TNF- $\alpha$  in den Probanden. Der tödliche Effekt von Endotoxin konnte in Tierversuchen durch Gabe eines monoklonalen anti-TNF- $\alpha$  Antikörpers verhindert werden (111, 112). Dass dieser Effekt TNF-Rezeptor vermittelt ist, zeigten Versuche von Secher et al.: Mäuse, die TNF-R1 und R2 defizient waren, entwickelten keine Symptome einer fulminanten Sepsis nach polymikrobieller Peritonitis (94). Eine weitere Studie mit diesen Mäusen zeigte eine höhere Überlebensrate im Endotoxinschock als Wildtypmäuse (80).

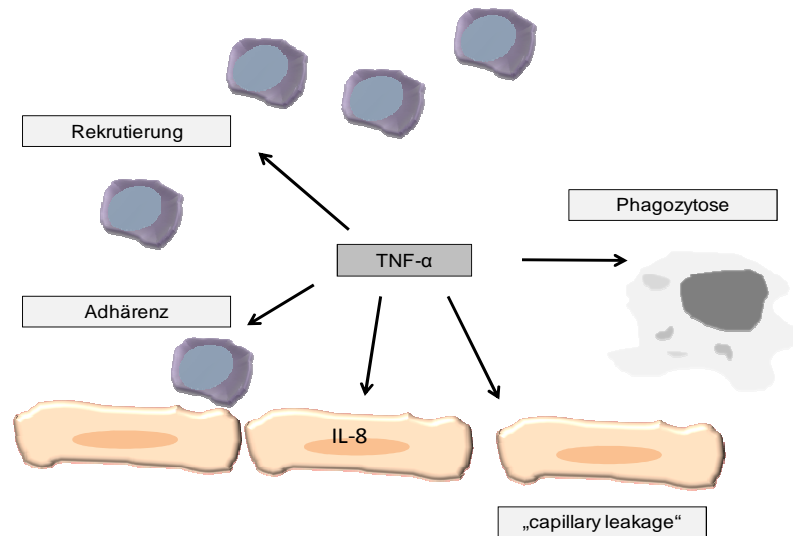


Abbildung 4: Schematische Zeichnung der Wirkung von TNF- $\alpha$  auf verschiedene Zellen  
Dargestellt sind Leukozyten (violette Zellen), eine Makrophage (graue Zelle) und Endothelzellen (orangefarbene Zellen) im Entzündungsprozess. TNF- $\alpha$  fördert die Rekrutierung und Adhärenz von Leukozyten sowie Phagozytose von Makrophagen, macht das Endothel durchlässiger und stimuliert die Produktion von IL-8 im Endothel (14, 95).

Jedoch spielt TNF- $\alpha$  auch bei *Autoimmunerkrankungen*, wie rheumatoider Arthritis, im *Asthma* und in der Entwicklung der *Tumorkachexie* eine Rolle (14, 26). Ein erhöhter Serumspiegel von TNF- $\alpha$  kann eine Kachexie provozieren. Es kommt dabei zu erhöhtem Proteinumsatz, Lipolyse, Anorexie und zur Anämie (113). Erhöhte Serumlevel von TNF- $\alpha$  wurden auch bei kachektischen Patienten mit einer Krebserkrankung, parasitären Infektion oder schwerer Herzinsuffizienz beobachtet (14). In der Pathogenese von Asthma ist bekannt, dass TNF- $\alpha$  an der Proliferation der glatten Muskelzellen in den Atemwegen beteiligt ist (52).

### 1.2.3 TNF-Rezeptoren

Die Rezeptoren *TNF-R1* und *TNF-R2* werden von vielen Zellen (Endothelzellen, Immunzellen, Fibroblasten) exprimiert und sind hauptsächliche Bindungspartner von  $\text{TNF-}\alpha$  (84). Sie gehören zur *TNFR-Superfamilie* und sind Glykoproteine (122). Die Rezeptoren dieser Superfamilie sind *Typ I Transmembranproteine*, die durch cysteinreiche Regionen in ihrer Primärstruktur charakterisiert sind (39). Wie  $\text{TNF-}\alpha$  bilden die Untereinheiten der TNF-Rezeptoren ein Trimer. Sie besitzen jeweils eine extrazelluläre, eine transmembrane und eine intrazelluläre Domäne. Die extrazelluläre Domäne des Rezeptors interagiert mit  $\text{TNF-}\alpha$  (45). *TNF-R1* enthält im intrazellulären Teil eine sogenannte Todesdomäne, die durch Stimulation mit  $\text{TNF-}\alpha$  aktiviert werden kann. Die Todesdomäne kann über Interaktion mit verschiedenen Proteinen *Caspasen* aktivieren, die den *kontrollierten Zelltod* (Apoptose) der Zelle einleiten (108, 109). Sowohl *TNF-R1* als auch *TNF-R2* besitzen noch weitere Domänen in ihrer Proteinstruktur, die mittels intrazellulären Adaptorproteinen *TNF receptor associating factors* (TRAFs) die Stimulation des Rezeptors mit der Aktivierung von intrazellulären Signalwegen verbindet (118, 119). *TNF-R1* aktiviert neben der apoptotischen Caspase-Kaskade unter anderem auch *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF- $\kappa$ B) und *c-Jun N-terminale Kinasen Signalwege*, *Lipasen* und *G-Protein gekoppelte Signalwege* (39, 59). NF- $\kappa$ B zum Beispiel reguliert als Transkriptionsfaktor im Zellkern die Genexpression von anti-apoptotischen und inflammatorischen Genen (61, 69). Im Gegensatz zu *TNF-R1* ist die Rolle von *TNF-R2* in zellulären Prozessen noch nicht ganz klar. Jedoch ist bekannt, dass *TNF-R2* über verschiedene TRAFs auch den NF- $\kappa$ B Signalweg induziert (24). Die Verbindung von TNF-Rezeptoren zu den verschiedenen intrazellulären Signalwegen kann die vielfältige Wirkung von  $\text{TNF-}\alpha$  im Organismus erklären (67).

### 1.3 Fragestellung

Die tiefen Atemwege der Säugetiere werden kontinuierlich durch Pathogene belastet, die schnellstmöglich entfernt werden müssen. Wie oben bereits beschrieben, ist die mukoziliäre Clearance ein wichtiger Reinigungsmechanismus der Atemwege, die zusätzlich zum Immunsystem kontinuierlich aktiv ist. Das Atemwegsepithel an sich kann auch als Teil des angeborenen Immunsystems angesehen werden. TNF- $\alpha$  spielt als Hauptmediator zwischen den Zellen des Immunsystems untereinander und zwischen Zellen des Immunsystems und Epithelzellen die zentrale Rolle in der Entzündungsreaktion. Er wird besonders in der systemischen Immunantwort und der Sepsis ubiquitär mit fatalen Folgen für den Organismus ausgeschüttet. TNF- $\alpha$  könnte hiernach auf das Flimmerepithel der unteren Atemwege, das als Teil des Immunsystems anzusehen ist, im Entzündungsprozess Einfluss nehmen. Aus dieser Hypothese ergaben sich folgende Fragen:

1. Verändert TNF- $\alpha$  die PTG oder die ZSF, die Voraussetzung für die mukoziliären Clearance sind?
2. Können Rezeptoren für TNF- $\alpha$  im Epithel nachgewiesen werden, die dafür verantwortlich sind?
3. Aktiviert TNF- $\alpha$  bekannte Signaltransduktionskaskaden im Trachealepithel der Maus?

Untersucht wurde in der vorliegenden Arbeit die PTG und ZSF mittels der *in vitro* Mikroskopie an explantierten Mastracheen, was *in vivo* der mukoziliären Clearance am nächsten kommt. In der Literatur wurde bereits erfolgreich die PTG und ZSF mit dieser Technik bestimmt. Zur Beantwortung der Fragestellung wurden pharmakologische als auch molekularbiologische Methoden angewandt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Die Tracheapräparation der adulten Maus

Für die Versuche wurden männliche C57/BL6N Mäuse, C57/Bl6J Mäuse oder JAX B6.129-Tnfrsf1a<sup>(tm1Mak/J)</sup>-Mäuse (TNF-R1<sup>-/-</sup> Mäuse) der Firma Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) verwendet. Die TNF-R1<sup>-/-</sup> Mäuse wurden von Charles River aus dem Jackson Laboratory (Maine, USA) bezogen. Die Tiere waren durchschnittlich 15 bis 18 Wochen alt und ca. 25 g schwer. Sie wurden in Käfigen mit einer ad libitum Wasser- und Futtersversorgung sowie einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 Stunden gehalten.

Die Mäuse wurden direkt vor den Versuchen mit einer Überdosierung Isofluran mit einer Konzentration von über 2% in der Atemluft in tiefe Narkose gelegt und mit einem Schnitt durch die Aorta abdominalis ausgeblutet.

Alle Versuche wurden in Übereinstimmung mit dem deutschen Tierschutzgesetz, entsprechend §1/§4/§17, durchgeführt.

Nach dem Tod des Tieres wurde das Diaphragma kaudal des Thorax längs entfernt. Die Rippen wurden am Knorpel-Knochen-Übergang kaudal nach kranial durchtrennt. Dann wurden beiderseits die Claviculae durchtrennt. Nun konnte die vordere Thoraxwand mit Sternum abgehoben werden und die Sicht auf die kollabierte Lunge und das Herz wurden freigeben.

Zuerst wurde die Glandula submaxillaris leicht angehoben und mit einer kleinen Schere im Ganzen entfernt. Das darunterliegende Fettgewebe wurde sorgfältig und vorsichtig weggeschnitten. Die infrahyoidale Muskulatur wurde ebenfalls mit einer kleinen Schere entfernt. Die Trachea war nun mit ihren Knorpelspangen gut sichtbar(s. Abbildung 5).

Als letzten Schritt vor der Entnahme der Trachea wurde der Ösophagus vorsichtig mit einer Pinzette gegriffen, hinter der Trachea vorgezogen und konnte anschließend mit einer Schere vorsichtig entfernt werden.

Im nächsten Schritt wurde die Trachea kaudal des Larynx durchtrennt. Daraufhin zog sich diese aufgrund ihrer elastischen Rückstellkraft zusammen. Mit einer Pinzette wurde die obere Knorpelspange der Schnittfläche gegriffen und die Trachea bis zum Larynx wieder herausgezogen. Jetzt konnte die Trachea kranial der

Bifurkation durchtrennt und der Maus entnommen werden. Nach dem letzten Schnitt wurde die Trachea mit der Pinzette festgehalten und sofort in ein trockenes Delta T Kulturschälchen (Bioprotech, Butler, USA) gelegt.

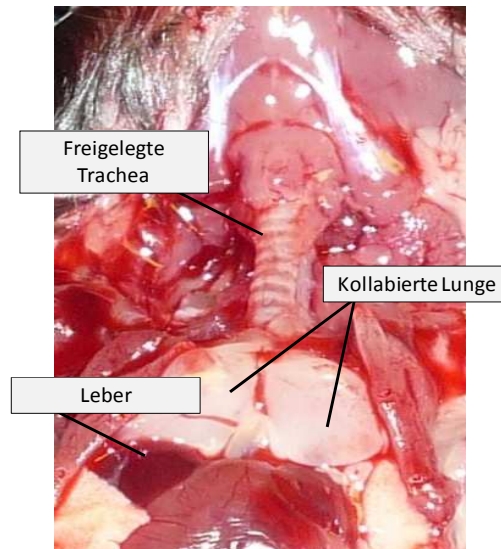


Abbildung 5: Aufnahme vom eröffneten Mausthorax  
Das Sternum mit vorderen Rippen und das Zwerchfell wurden entfernt. Kaudal der kollabierten Lunge ist die Leber zu sehen, cranial die freigelegte Trachea mit der ihr anhaftenden hyoidalen Muskulatur. Es sind die Knorpelspangen deutlich zu erkennen.

Das Delta T Kulturschälchen wurde unter das Objektiv des Stereomikroskops (Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland) gelegt und die Trachea fokussiert. Die Trachea sollte mit dem Musculus trachealis nach oben zeigen und zentral in der Mitte des Schälchens platziert sein.

Anschließend wurde sie mit zwei Minuten (Fiebig Lehrmittel, Berlin, Deutschland) in ihrer natürlichen Streckung aufgespannt und nachfolgend mit 4-5°C kaltem HEPES-Puffer pH 7,4 bedeckt. Die Zeit von Entfernen der Trachea aus dem Thorax bis zur Wässerung im Schälchen betrug ca. eine Minute.

Noch der Trachea anhaftendes Fettgewebe und Reste von Blutgefäßen wurden nun vorsichtig mit einer Vannas Tübingen Schere (FST, Heidelberg, Deutschland) und einer feinen Pinzette unter dem Stereomikroskop entfernt. Danach wurde das Schälchen mit frischem kaltem HEPES-Puffer (4-5°C, pH 7,4) gespült. Nach dem Entfernen der Gewebereste stellte sich die Trachea mit einem weißlich durchsichtigen Aspekt dar und der M. trachealis war als Längsstrich gut sichtbar.



Anschließend wurde der *M. trachealis* dorsal der Länge nach aufgeschnitten, so dass die Knorpelspangen sich öffneten (s. Abbildung 6).

Der Sitz der Minutien wurde nochmals überprüft und korrigiert. Das Schälchen wurde nochmals mit kaltem HEPES-Puffer (4-5°C, pH 7,4) ausgetauscht, gespült und in den Messstand eingespannt. Nach dem Einspannen der Versuchskammer in die Mikroskophalterung wurde der kalte HEPES-Puffer durch 2 ml warmen HEPES-Puffer (37°C) ersetzt. Nun wurde das vorgewärmte 20er Objektiv oder 40er Objektiv über die Trachea eingetaucht. Dies musste bis spätestens zur 25. Minute nach dem Tod des Tieres geschehen, damit das Schälchen mit der Trachea genügend Zeit zum Erreichen der kalibrierten Temperatur hatte.

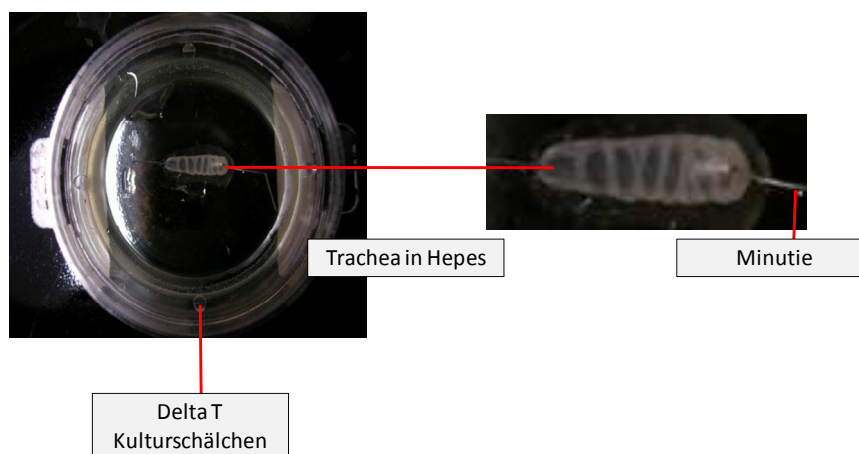


Abbildung 6: Trachea im Delta T Kulturschälchen

Das Bild zeigt die mit Minutien aufgespannte Trachea. Der *M. trachealis* wurde bereits aufgeschnitten. Der Blick ist somit auf die Knorpelspangen und den Abschnitten zwischen diesen frei. Mit freundlicher Genehmigung von Petra Mermer, Institut für Anatomie und Zellbiologie der Justus-Liebig Universität Gießen.

Der HEPES-Puffer wurde mit folgenden Substanzen angesetzt: 5,9 mM Kaliumchlorid (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), 136,4 mM Natriumchlorid (Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland), 11 mM Glucose (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), 10 mM HEPES (Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland), 1mM Magnesiumchlorid-6-hydratlösung (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), 2,2 mM Kalziumchlorid-2-hydratlösung (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland). Diese Lösung wurde darauf mit 1 molaren Lösung Natriumhydroxid (NaOH) (Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland) auf den pH-Wert 7,4 bei 30°C titriert.

## **2.2 Die Messung der Partikeltransportgeschwindigkeit und der Zilienschlagfrequenz**

Die Messungen der Partikeltransportgeschwindigkeit (PTG) und der ZSF erfolgten an einem Olympus BX61WI Lichtmikroskop (Olympus GmbH, Hamburg, Deutschland) mit einem Objektiv LUMPlanFl Hellfeld Transmissionsobjektiv 20x/0.50W (Olympus GmbH, Hamburg, Deutschland) für PTG oder einem Objektiv LUMPlanFl Hellfeld Transmissionsobjektiv 40x/0.50W (Olympus GmbH, Hamburg, Deutschland) für ZSF. Im Strahlengang zu den Okularen war eine monochrome Kamera Imago OCD (T.I.L.L. Photonics GmbH, Gräfeling, Deutschland) integriert, die wiederum mit einem Computer verbunden war. So konnten die Bilder direkt aus dem Strahlengang auf den Computer übertragen werden (s. Abbildung 7).

### **2.2.1 Vorbereitung des Delta T Kulturschälchens**

Vorbereitend für die Organversuche wurde der Boden des Delta T Kulturschälchens mit 1,5 ml Sylgard 184 (Dow Corning GmbH, Wiesbaden, Deutschland), einem klaren Silikonelastomer, ausgegossen und bei 60°C auspolymerisiert. Nach Aushärtung des Sylgards wurde das Schälchen in den Halter des Mikroskops eingespannt und mit 2 ml Aqua dest. gefüllt. Die Versuchskammerhalterung ist mit einem integrierten Heizsystem ausgestattet, die eine Konstanthaltung der Temperatur ermöglicht. Nachfolgend wurde eine fortlaufende Temperaturmessung mit eingetauchtem 20er Objektiv des Mikroskops durchgeführt. In einem Zeitraum über 15 Minuten wurde in Abständen von 5 Minuten mittels eines externen digitalen Thermometers und des Referenzthermometers des Messstandes in der Mitte des Kulturschälchens die Temperatur bestimmt. Das Thermostat wurde unterdessen so reguliert, sodass eine konstante Temperatur von 30°C am Boden des Schälchens aufrecht erhalten wurde. Nach Beendigung der Kontrollmessung wurde die Temperatur von der digitalen Anzeige des Thermostats abgelesen und mit einem Filzmarker auf das Schälchen geschrieben. Bei jedem Versuch wurde die dokumentierte Temperatur am Thermostat eingestellt.

### **2.2.2 Vorbereitung des Messstandes**

Vor der Organentnahme wurde der Versuchstand vorbereitet. Zehn Minuten vor Präparationsbeginn wurde ein leeres Kulturschälchen in die Halterung des

Objekttischs eingespannt und mit 2 ml Aqua dest. gefüllt. Das Objektiv wurde eingetaucht, die Lichtquelle und das Heizsystem eingeschaltet. Sollte die PTG gemessen werden, wurde das 20er Objektiv vorgewärmt. Sollte die ZSF gemessen werden, wurde das 40er Objektiv vorgewärmt. Am Thermostat wurde die Temperatur für das im Versuch verwendete Kulturschälchen eingestellt.

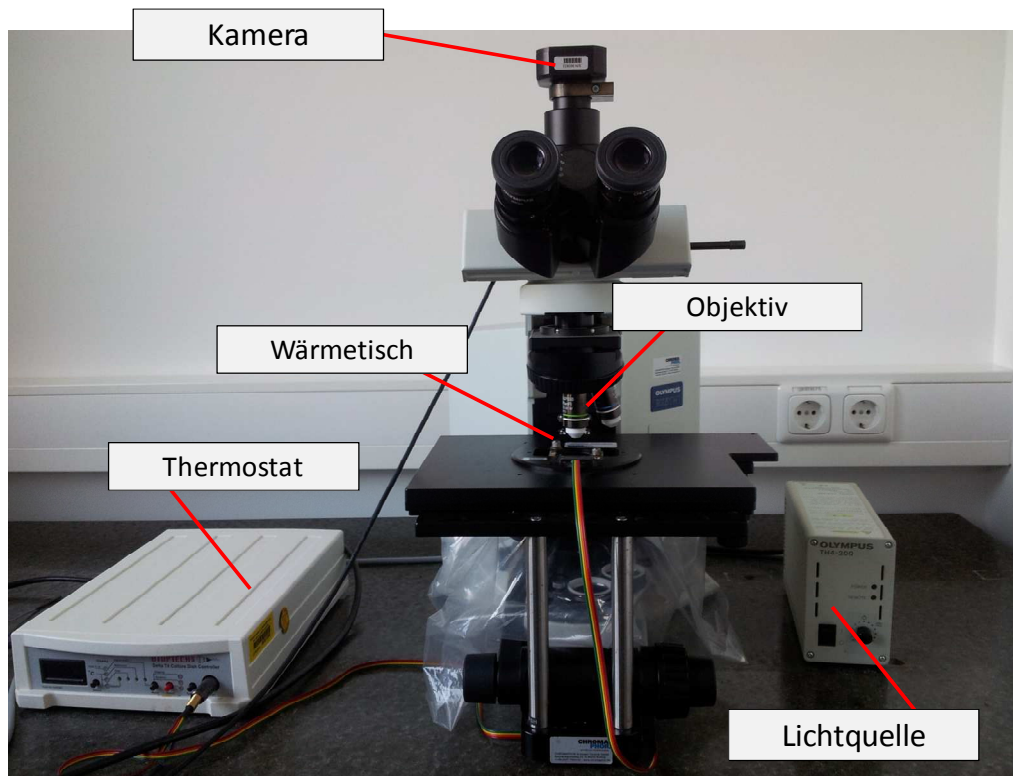


Abbildung 7: Aufbau des Messstandes

Frontalansicht des Messstandes. Oben am Mikroskop ist die Kamera befestigt. Das Objektiv ist oberhalb des Wärmetisches (Versuchskammerhalterung mit integriertem Heizkammersystem) zu sehen, welcher mit dem Thermostat verbunden ist. Rechts neben dem Mikroskop befindet sich die Lichtquelle.

### 2.2.3 Messung der Partikeltransportgeschwindigkeit

Für die Messung der PTG mussten spätestens zwei Minuten vor der Messung 3  $\mu\text{l}$  der *Dynabeads* (DynaBiotech, Oslo, Norwegen) beiderseitig der Trachea in das Medium einpipettiert und vorsichtig mit der Pipette vermischt werden. Dynabeads sind industriell hergestellte Polystyrenkügelchen mit einem Durchmesser von ungefähr 4,5  $\mu\text{m}$ . Die Suspension lag mit einer Konzentration von 30000 Dynabeads pro  $\mu\text{l}$  vor.

Nach Fokussierung mit dem 20er Objektiv wurde eine Region der Tracheaoberfläche zwischen zwei Knorpelspangen ausgesucht. Diese Region sollte

keine liegegebliebenen Dynabeads aufweisen und die Dynabeads in eine Richtung transportieren.

Die Messungen starteten zur 30. Minute nach Tötung des Tieres. Ab diesem Zeitpunkt wurde der Partikeltransport in vorgegebenen Zeitabständen (s. Protokoll) mit der Kamera aufgenommen. Es wurden 200 Bilder pro Film bei Durchlicht angefertigt. Die Auflösung des Chips der Kamera betrug 1280x960 Bildpunkte. Die Aufnahmen wurden direkt nach der Aufzeichnung auf der Festplatte gespeichert und konnten für die im Nachhinein folgende *offline* Auswertung verwendet werden. Während des Versuchs wurde 90 Sekunden vor jeder Messung der Puffer vorsichtig mit einer Pipette vermischt.

### **2.2.4 Messung der Zilienschlagfrequenz**

Für die Messung der ZSF wurden Regionen der Tracheaoberfläche aufgesucht, in denen mindestens zehn zilientragende Zellen identifiziert werden konnten. Wenn diese Zellen gleichmäßig über das Sichtfeld verteilt waren, wurde die Einstellung für die Dauer des Versuches beibehalten. Die Messung erfolgte mit der gleichen Kamera wie bei der PTG-Bestimmung, jedoch wurde hier die Auflösung auf 640x480 Bildpunkte heruntersetzt, pro Film wurden 1000 Bilder aufgezeichnet. Während des Versuchs wurde 90 Sekunden vor jeder Messung der Puffer vorsichtig mit einer Pipette vermischt.

### 2.2.5 Versuchsprotokolle

Die Versuchsprotokolle zur Bestimmung der ZSF und PTG waren im Ablauf gleich. Ab der 30. Minute post mortem wurde protokolliert. Jeder Messpunkt stellte eine Zeitangabe dar. Die Messpunkte wurden in Minuten angegeben. Alle Versuche gliederten sich in drei Zeitabschnitte. Im ersten Teil wurde von der 30. bis zur 60. Minute immer alle fünf Minuten gemessen. Die 60. Minute stellte die Baseline dar. Der zweite Teil erstreckte sich von der 60. bis zur 120. Minute. In jedem Versuch wurde das Pharmakon TNF- $\alpha$  mit einer Pipette zum Puffer 90 Sekunden vor der 63. Minute beigefügt. Es wurden Konzentrationen von 100 ng/ml bis 1000 ng/ml verwendet. Ab der 63. Minute wurde alle drei Minuten gemessen. Im dritten und letzten Zeitabschnitt wurde von der 120. bis zur 130. Minute alle zwei Minuten gemessen. 90 Sekunden vor der 122. Minute wurde ATP als Vitalitätskontrolle hinzugeben.

Für die Kontrollen bestand dieselbe zeitliche Gliederung mit dem Unterschied, dass anstatt des Pharmakons Aqua dest. zupipettiert wurde. Die Volumina variierten zwischen 2 und 20  $\mu$ l.

Das Versuchsprotokoll zur Bestimmung der ZSF in TNF-R1<sup>-/-</sup> Mäusen und des korrespondierenden Stammes war mit dem oben beschriebenen identisch.

Für die Versuche, in denen vor der TNF- $\alpha$  Gabe ein Agens zugegeben werden sollte, galt das gleiche Protokoll. Das Agens wurde zum Zeitpunkt des Wechsels mit dem warmen HEPES zugefügt. Dieser Wechsel fand nach der Beendigung der Präparation statt, wenn das Delta T Kulturschälchen in dem Versuchsstand eingesetzt wurde. Danach wurde in allen Versuchsreihen wie oben beschrieben TNF- $\alpha$  vor der 63. Minute hinzugegeben (s. Abbildung 8). Die Konzentration von TNF- $\alpha$  betrug bei allen Versuchen 360 ng/ml. Der Ablauf der Kontrollen wurde beibehalten, aber nur das Agens für die Kontrollen wurde zugegeben.

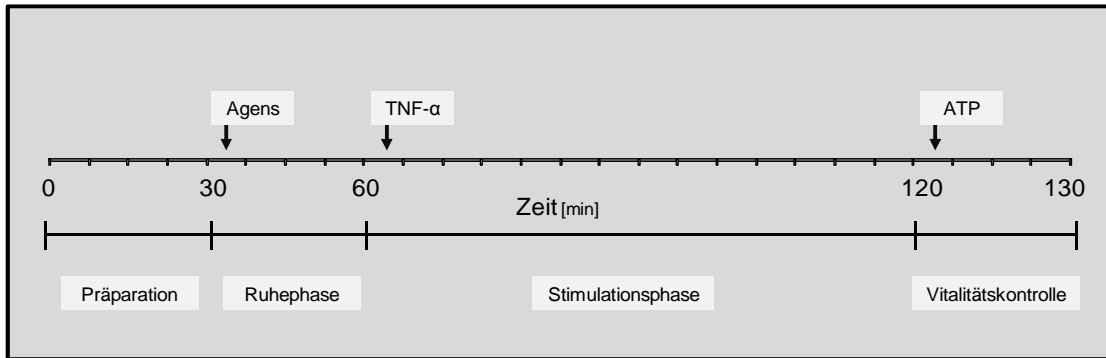


Abbildung 8: Versuchsprotokoll für TNF- $\alpha$  und Inhibitoren

Gekennzeichnet sind die vier verschiedenen Phasen (Präparation, Ruhe- und Stimulationsphase und Vitalitätskontrolle) des Versuchs anhand einer Zeitachse in Minuten. Die kleinen Intervalle auf der Zeitachse geben die Messzeitpunkte in den Phasen an. Der Zeitpunkt des Zusatzes der verschiedenen Pharmaka ist mittels Pfeilen hervorgehoben.

Die folgende Tabelle 1 gibt einen Überblick über die in den Versuchen verwendeten Pharmaka.

Tabelle 1: Verwendete Pharmaka in den Versuchen zur Messung der ZSF und PTG

| Pharmakon                         | Hersteller/ Lieferant                        |
|-----------------------------------|--|
| Adenosintriphosphat               | Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland   |
| Atropin                           | Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland   |
| Isofluran                         | Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland |
| L-NMMA                            | Alexis Biochemicals, San Diego, USA          |
| L-NAME                            | Alexis Biochemicals, San Diego, USA          |
| Methysergide                      | Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland   |
| TNF alpha                         | Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland   |
| armenian hamster IgG Isotype Ctrl | BioLegend GmbH, Fell, Deutschland            |
| anti-mouse CD 120 a               | BioLegend GmbH, Fell, Deutschland            |

### 2.2.6 Offline Datenauswertung

Für die Auswertung der gemessenen Daten der PTG wurden mittels der Software Image Pro Plus Analyzer 6.2 (Media Cybernetics, Silver Spring, USA) die gespeicherten Messungen offline ausgewertet. Jede Messung entsprach einem Film und wurde nacheinander im Programm aufgerufen. Der aufgerufene Film wurde von seiner ursprünglichen 12 Bit Graustufe in 8 Bit umgewandelt. Danach erfolgte eine Hintergrundkorrektur, um ein binäres Bild zu erzeugen, in dem der Hintergrund schwarz und die Partikel weiß waren. Die Software bestimmte die zurückgelegte Distanz ( $d$ ) der einzelnen Partikel und errechnete daraus die Geschwindigkeit ( $v=d/t_{(2)}-t_{(1)}$ ;  $t$ =Zeit).

Das Programm unterschied zwischen idealer Distanz (=direkter Distanz zwischen Start und Endpunkt) und akkumulierter Distanz (=Summe aller Distanzen vom Startpunkt aus), da nicht alle Partikel geradlinig laufen. Für die Ermittlung berechnete die Software aus den Größen Geschwindigkeit, idealer Distanz und akkumulierter Distanz:

1. den Mittelwert der Durchschnittsgeschwindigkeit aller Partikel (MW)
2. den Median der Durchschnittsgeschwindigkeit aller Partikel (MD)
3. den Mittelwert der Durchschnittsgeschwindigkeit aller Partikel, deren zurückgelegter Weg nicht mehr als 15% von der idealen Distanz abweicht (MW 1,15)
4. den Median der Durchschnittsgeschwindigkeit aller Partikel, deren zurückgelegter Weg nicht mehr als 15% von der idealen Distanz abweicht (MD 1,15).

Mittels MW 1,15 und MD 1,15 konnten Partikel ausgeschlossen werden, die mehr als 15% von der idealen Distanz abwichen. Dies half, sich im Kreis drehende oder liegende Partikel auszuschließen. Zur besseren Übersicht im Ergebnisteil dieser Arbeit wurden nur die Mittelwerte der PTG und deren Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt.

Für die Auswertung der gemessenen Daten der ZSF wurde der Film jeder aufgezeichneten Messung im Programm Image Pro Analyzer 6.2 aufgerufen. Die Auswertung der Aufnahme der 30. Minute diente als Vorlage für alle folgenden Auswertungen. Im Programm wurden jeweils zehn zilientragende Zellen umzeich-

net, gespeichert und in einer vorher ausgedruckten Aufnahme der 30. Minute eingezeichnet. Diese Zellen wurden als „region of interest“ mit den Zahlen eins bis zehn nummeriert und für alle folgenden Auswertungen beibehalten. Mit der ausgedruckten Vorlage konnte somit immer kontrolliert werden, welche zilienträgenden Zellen ausgewählt wurden. Innerhalb dieser Regionen konnte das Programm durch die Veränderung der Graustufen den Zilienschlag errechnen. Die ermittelten Werte wurden in das Programm AutoSignal (SeaSolve Software Inc, Chicago, USA) transferiert. Dort wurde die durchschnittliche ZSF einer Zelle mit Hilfe einer Fast Fourier Transformation errechnet. Die zehn Werte der verschiedenen Zellen wurden gemittelt und ergaben den Wert der ZSF zum Zeitpunkt der Messung.

## **2.3 Der Nachweis von TNF-Rezeptoren anhand der Expression von mRNA**

### **2.3.1 RNA-Isolierung und Transkription**

Um die RNA aus Tracheen adulter Mäuse zu isolieren, wurde die Trachea mit dem „RNeasy mini kit“ (Qiagen, Hilden, Deutschland) aufbereitet. Das Gewebe wurde mit 350 µl Lysis-Puffer versetzt und in einer Kugelmühle fünf Minuten homogenisiert.

Das so entstandene Lysat wurde 3 Minuten lang bei 16085g zentrifugiert. Der Überstand wurde zu gleichen Teilen mit Ethanol verdünnt und auf eine Waschsäule aufgetragen (zwei Minuten zentrifugiert bei 16085g). Die abzentrifugierte Flüssigkeit wurde verworfen. Auf die Säule wurde nun 700 µl RW1 Waschpuffer aufgetragen und wieder eine Minute bei 16085g zentrifugiert. Die Flüssigkeit wurde erneut verworfen. Im nächsten Schritt wurde 700 µl RPE1 Waschpuffer auf die Säule aufgetragen und zwei Minuten zentrifugiert. Zuletzt wurde die Säule in ein neues Eppendorfgefäß gesetzt. Auf die Säule wurde 30 µl Wasser aufgetragen und zwei Minuten zentrifugiert. Dieses Eluat enthielt die gewonnene RNA. Mit Hilfe eines Photometers (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) wurde es auf den Gehalt an RNA überprüft.

Aus dem oben genannten Eluat wurde nun cDNA für die qPCR und PCR synthetisiert. Als erstes wurde DNase (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) dem



Eluat zugefügt und für 15 Minuten bei 25°C inkubiert, um die genomische DNA zu verdauen.

Damit eine Konzentration von 1000 µg/ml RNA in der endgültigen Probe war, wurden je Probe und RNA-Gehalt der Probe 1-8 µl Eluat und jeweils 1 µl DNase eingesetzt. Dies wurde mit Wasser und 1 µl 10x RT Puffer (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) auf eine Gesamtmenge von 10 µl aufgefüllt. Um den Verdau durch die DNase zu unterbrechen, wurde im nächsten Schritt 1 µl EDTA zugegeben und für zehn Minuten bei 65°C inkubiert. Im Folgenden wurden die Proben für zehn Minuten bei 4°C gekühlt. Als nächstes wurde die cDNA synthetisiert, in dem den Proben jeweils 2 µl Dithiothreitol (DTT) (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), 4 µl 10x RT Puffer, 1µl Oligonukleotidsequenzen/Nukleotide (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) und 1µl Reverse Transkriptase (RT) (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) zugegeben wurden. Einer zusätzlichen Probe wurde anstatt RT Wasser zugefügt, die dann als Minus-RT-Kontrolle mitlief. Zum Abschluss wurden alle Proben für 50 Minuten bei 42°C umgeschrieben. Dieser Vorgang wurde nach einer Minute bei 72°C abgebrochen und danach auf 4°C abgekühlt (s. Tabelle 2).

Tabelle 2: Verwendete Reagenzien in Reihenfolge der Zugabe für die Isolierung von mRNA

| <b>Pharmakon</b>      | <b>Volumen</b> | <b>Hersteller/Lieferant</b>        |
|-----------------------|----------------|------------------------------------|
| Eluat                 | 1-8 µl         | Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland |
| DNase                 | 1 µl           | Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland |
| 10x RT Puffer         | 1 µl           | Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland |
| EDTA                  | 1 µl           | Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland |
| DTT                   | 2 µl           | Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland |
| 10x RT Puffer         | 4 µl           | Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland |
| dNTPs                 | 1 µl           | Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland |
| Reverse Transkriptase | 1 µl           | Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland |

### 2.3.2 Polymerasekettenreaktion

Die zuvor synthetisierte cDNA diente als Template für die PCR. Zur Amplifikation der DNA wurden 5 µl Template und 45 µl Master-Mix aus den Reagenzien des GoTaq® PCR Core System (Promega, Madison, USA) verwendet (s. Tabelle 3).

Die Amplifikation wurde mit folgendem Programm im Thermocycler (Mastercycler Gradient, Eppendorf, Deutschland) durchgeführt: Zuerst wurde der DNA-Doppelstrang durch Erhitzen auf 95°C für 2 Minuten geschmolzen und das Enzym GoTaq Polymerase aktiviert. Dann wurden 30 Zyklen folgenden Verlaufs durchgeführt: Denaturierung der DNA-Doppelstränge durch Erhitzung für 1 Minute auf 95°C; Hybridisierung der Primer an die einzelnen DNA-Stränge bei einer Annealing-Temperatur von 56°C für 1 Minute; Syntheseneuer Fragmente durch die Taq-Polymerasen bei 72°C für 1 Minute. Nach Beendigung der Zyklen wurde für 5 Minuten die Temperatur auf 72°C gehalten, um die noch nicht abgeschlossene Replikation von DNA-Fragmenten zu vervollständigen. Anschließend erfolgte eine Abkühlung des Reaktionsprodukts auf 4°C.

Tabelle 3: Master-Mix für die PCR

| Pharmakon                    | Volumen   | Hersteller/Lieferant  |
|------------------------------|-----------|-----------------------|
| GoTaq® Flexi Buffer          | 110 µl    | Promega, Madison, USA |
| Magnesiumchlorid             | 44 µl     | Promega, Madison, USA |
| dNTPs (PCR Nucleotide)       | 11 µl     | Promega, Madison, USA |
| Primer (Forward und Reverse) | 22 µl     | Promega, Madison, USA |
| GoTaq® Polymerase            | 2,75 µl   | Promega, Madison, USA |
| Template DNA                 | 11 µl     | Promega, Madison, USA |
| Nuclease freies Wasser       | 349,25 µl | Promega, Madison, USA |

Um eine Verunreinigung des Master-Mix zu kontrollieren, wurde RNase freies Wasser anstatt cDNA als Negativkontrolle verwendet. Primerpaare des Polypeptids  $\beta$ -2-Mikroglobulin wurden als Positivkontrolle verwendet, um zu überprüfen, ob die RNA-Isolierung und die cDNA-Synthese erfolgreich war.  $\beta$ -2-Mikroglobulin kommt

in allen eukaryoten Zellen vor. Als Positivkontrolle wurde cDNA von murinen Leukozyten Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) verwendet, da bekannt ist, dass diese positiv für TNF-R1 und TNF-R2 sind.

Es wurden intronspannende Primerpaare verwendet, somit konnten die neu synthetisierten DNA-Fragmente von eventuell nach dem DNAase-Verdau noch vorhandener genomischer DNA differenziert werden (s. Tabelle 4).

### 2.3.3 Quantitative Polymerasenkettenreaktion

Die qPCR nutzt die Eigenschaften eines interkalierenden Farbstoffs, dessen Fluoreszenz mit einem PCR-Zykler gemessen werden kann. Das heißt, mit Zunahme des PCR-Produkts (Amplifikon) stieg auch die Fluoreszenz proportional an, da immer mehr Farbstoff in die Doppelbindung der DNA integriert wurde. Ab einer gewissen Menge des Amplifikons stieg die Fluoreszenz exponentiell an, bis eine Sättigung erreicht wurde. Der Zeitpunkt des linearen Anstiegs war abhängig von der in der Probe enthaltenen cDNA. Dies ergab dann einen Rückschluss auf den RNA-Gehalt des Zielgens in der Ausgangsprobe.

Um die Reaktion vorzubereiten, wurde im ersten Schritt eine Grundmischung für jeden Primer (s. Tabelle 4) vorbereitet. Diese Mischung enthielt: 12,5 µl „SybrGreen Mastermix“ (Biorad, Kalifornien, USA) und 9,75 µl Wasser. Anschließend wurden jeweils 0,75 µl des Forward- und des Reverseprimers in einer Verdünnung von 1:10 eingesetzt. Diese Mischung wurde nun für jede Probe als Doublette in deckellose Reaktionsgefäße aliquotiert. Daraufhin wurden 2 µl der vorbereiteten cDNA eingesetzt.

Im MyiQ2 Real Time Detection System (Biorad, Kalifornien, USA) wurden die Proben mit folgendem Protokoll amplifiziert: Aktivationsphase für fünf Minuten bei 95°C, danach 40 Zyklen á 20 Sekunden jeweils 95°C, 42°C, 75°C. Sobald die 40 Zyklen beendet waren, wurde eine Schmelzkurve erstellt und die Temperatur im Zykler bei 20°C gehalten.

Der sogenannte *CT-Wert* war der Zyklus, durch den willkürlich eine Schwelle zu einem Zeitpunkt gesetzt wurde, ab dem die Fluoreszenz der Probe linear anstieg. Die Differenz zwischen dem CT-Wert des Zielgens und des Housekeeping-Gens war der

sogenannte  $\Delta CT$ -Wert. Der  $\Delta CT$ -Wert wurde dazu benötigt, um die relative Expression mit folgender Formel zu bestimmen:  $v_{rel. Expression} = 2^{-\Delta CT}$ .

Tabelle 4: Verwendete Primer in der qPCR und PCR

| Gen            | Sequenz   | Produkt | Hersteller/Lieferant                        |
|----------------|---|---------|---|
| TNF-R1         | s: ATCTGCTGCACCAAGTGCC<br>as: TGCATGGCAGTTACACACG   | 342 bp  | Invitrogen, Darmstadt, Deutschland          |
| TNF-R2         | s: TACCAAGGGTGGCATCTCTC<br>as: TCCTGGGATTTCTCATCAGG | 171 bp  | Invitrogen, Darmstadt, Deutschland          |
| Slc25a3        | s: CACCTTGAGGGAAGCTGTTC<br>as: GATCGCACAGAAGACTCCAG | 324 bp  | Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland |
| $\beta$ -Actin | s: ATATCGCTGCGCTGGTCGTC<br>as: GATCGCACAGAAGACTCCAG | 517 bp  | Invitrogen, Darmstadt, Deutschland          |

### 2.3.4 Durchführung der Gelelektrophorese

Zur weiteren Auswertung der Proben der qPCR wurden diese auf ein ethidiumbromidhaltiges Agarose Gel aufgetragen und mit 6  $\mu$ l „Orange-G“ Ladepuffer (Sigma-Aldrich, USA) beladen. Die Proben wurden bei 100 V für 40 Minuten in einer Gelelektrophoresekammer aufgetrennt. Das Gel wurde im Anschluss in Referenz zu 10  $\mu$ l 100 bp DNA Ladder (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) in einer UV-Kammer analysiert.

Zur Auswertung der Proben der PCR wurde ein 2%iges Agarose Gel für die Gelelektrophorese vorbereitet. Die Proben wurden für 20 Minuten bei 95 V in einer Gelelektrophoresekammer aufgetrennt. Das Gel wurde danach im SybrGreen haltigen (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) Tris-Acetat-EDTA Puffer eingefärbt und in Referenz zu 10  $\mu$ l 100 bp DNA Ladder in einer UV-Kammer analysiert.

Für die Gelelektrophorese wurden 1% und 2% Gele hergestellt. Für das 1% Gel wurden 1,5 g Agarose HR plus (Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland) - bzw. 3 g für das 2%ige Gel- in ein Becherglas gegeben und mit 150 ml Tris-Acetat-Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) gelöst. Für das Lösen der Agarose wurde die Suspension in einer Mikrowelle erwärmt.

Der Tris-Acetat-EDTA Puffer wurde bei Raumtemperatur (22°C) hergestellt. Dieser beinhaltet 242 g Tris (Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland), 100 ml 0,5

M Natrium EDTA(Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland) und 57,1 ml Essigsäure (60,05 g/mol) (Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland). Nach dem Einwiegen und Lösen der Substanzen wurde das Volumen mit Aqua dest. auf 1 Liter aufgefüllt.

### **2.4 Statistik**

Zur statistischen Datenanalyse wurde die Software SPSS 19.0 (SPSS Inc. Headquarters Chicago Illinois, USA) verwendet. Zur Überprüfung der TNF- $\alpha$  induzierten Veränderung der PTG und ZSF wurde der Kolmogorow-Smirnow-Test durchgeführt, gefolgt vom Mann-Whitney-U-Test für nicht-parametrische Daten oder Two-way ANOVA, gefolgt vom Bonferroni post-Test. Die Ergebnisse wurden bei  $p \leq 0,05$  als signifikant und  $p \leq 0,01$  als hochsignifikant eingestuft. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte als Boxplots mit den Minimum-, Maximum- und Medianwerten sowie den Perzentilen 25 und 75. Zur Überprüfung der Korrelation zwischen ZSF und PTG wurde der Spearman-Test herangezogen. Die Werte des Korrelationskoeffizienten  $r$  wurden eingestuft von 0 bis 0,2 als sehr schwache, bis 0,5 als schwache, bis 0,7 als mittlere, bis 0,9 als starke und über 0,9 als sehr starke Korrelation.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Die Überprüfung der ziliären Tätigkeit unter Exposition von TNF- $\alpha$

#### 3.1.1 Partikeltransportgeschwindigkeit unter Exposition von TNF- $\alpha$

Um zu testen, ob sich die PTG dosisabhängig nach Exposition von TNF- $\alpha$  veränderte, wurde zunächst TNF- $\alpha$  in einer Konzentration von 100 ng/ml dem Organbad zugefügt. In den nächsten Versuchsgruppen wurde die Konzentration erst auf 250 ng/ml dann auf 360 und zuletzt auf 1000 ng/ml gesteigert.

Der Mittelwert der Baseline betrug vor der Zugabe von 100 ng/ml TNF- $\alpha$  dieser Versuchsreihe mit 9 Tieren  $46,5 \pm 14,7$   $\mu\text{m/s}$ . 39 Minuten und 60 Minuten nach Applikation konnte kein signifikanter Anstieg festgestellt werden ( $p=0,138$  und  $p=0,560$ ). Zu diesem Zeitpunkt betragen die Mittelwerte  $40,8 \pm 13,7$   $\mu\text{m/s}$  und  $50,5 \pm 21,4$   $\mu\text{m/s}$ . 39 und 60 Minuten nach Applikation von 250 ng/ml TNF- $\alpha$  konnte in diesen Versuchsreihen auch kein signifikanter Anstieg beobachtet werden ( $n=3$ ;  $p=0,323$  und  $p=0,160$ ; die Versuche wurden hier nicht als Grafik gezeigt). Ab einer Konzentration von 360 ng/ml TNF- $\alpha$  kam es 60 Minuten nach Stimulation zu einem signifikanten Anstieg ( $p \leq 0,05$ ). Der Mittelwert der 120. Minute war  $63,3 \pm 32,4$   $\mu\text{m/s}$ , der der Baseline  $39,5 \pm 18,2$   $\mu\text{m/s}$  ( $n=5$ ; s. Abbildung 10). Eine Konzentrationssteigerung auf 1000 ng/ml TNF- $\alpha$  bewirkte zwar 60 Minuten nach Stimulation ( $p=0,054$ ) keine signifikante Erhöhung der PTG, doch betrug der Mittelwert der 120. Minute  $58,0 \pm 22,2$   $\mu\text{m/s}$  im Vergleich zur Baseline  $36,2 \pm 14,4$   $\mu\text{m/s}$  ( $n=5$ ). Zur Kontrolle wurden Versuche nur mit Wasser anstelle von in Wasser gelöstem TNF- $\alpha$  durchgeführt ( $n=8$ ). Zu keinem Zeitpunkt (93. Minute und 120. Minute) vor der Stimulation mit ATP konnte ein Anstieg der PTG beobachtet werden ( $p=0,052$  und  $p=0,494$ ). Nach der Stimulation mit ATP erhöhte sich der Mittelwert der PTG auf  $79,7 \pm 23,9$   $\mu\text{m/s}$  und war somit höher als der Mittelwert der PTG der 120. Minute ( $24,2 \pm 10,3$   $\mu\text{m/s}$ ;  $p \leq 0,01$ ). Der Mittelwert der Baseline betrug  $25,1 \pm 9,0$   $\mu\text{m/s}$  (s. Abbildung 9).

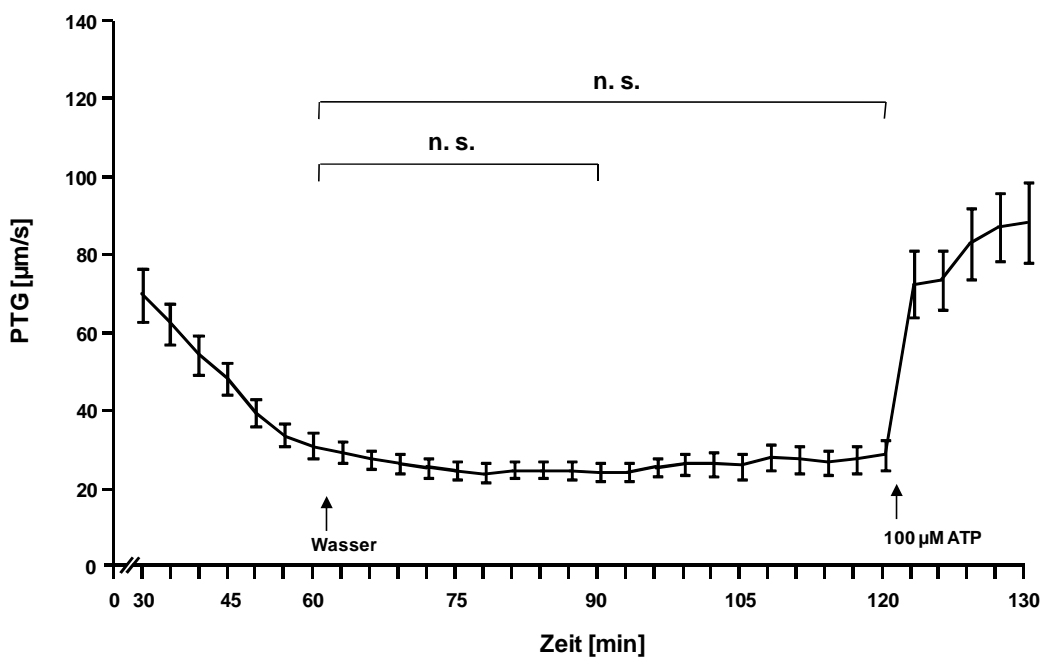


Abbildung 9: Die Basalrate der PTG unter Kontrollbedingungen

Nach Zugabe von Wasser (Minute 60) kam es zu keinem signifikanten Anstieg der PTG nach 39 Minuten und 60 Minuten nach Applikation ( $p=0,052$  und  $p=0,494$ ). Nach der Applikation von  $100 \mu\text{M}$  ATP (Vitalitätskontrolle) kam es zu einem Anstieg der PTG (Signifikanz nicht dargestellt). Dargestellt ist der MW und der SEM, n.s.=nicht signifikant,  $n=8$ , Two-way ANOVA.

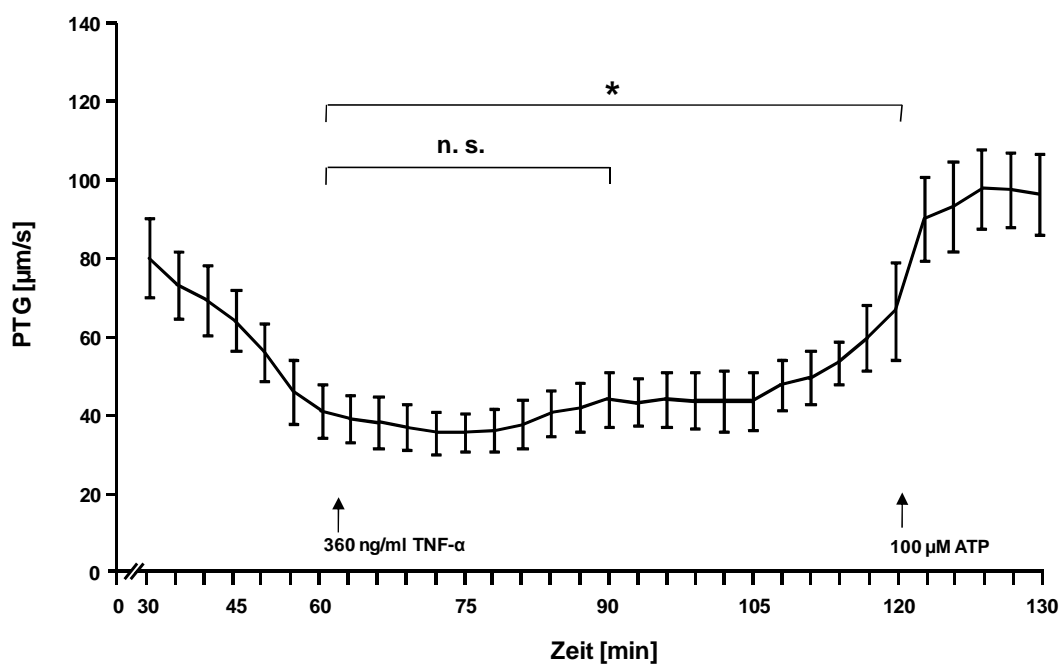


Abbildung 10: TNF- $\alpha$  steigert die PTG der murinen Trachea

Die Applikation von  $360 \text{ ng/ml}$  TNF- $\alpha$  stimuliert nach 60 Minuten die PTG, dieser Effekt war zum ersten Messzeitpunkt (39 Minuten) noch nicht nachweisbar. Dargestellt ist der MW und der SEM,  $*p<0,05$ , n.s. = nicht signifikant,  $n=5$ , Two-way ANOVA.

Um die verschiedenen Versuchsgruppen miteinander vergleichen zu können, wurden die Mittelwerte auf die 60. Minute normalisiert und mittels explorativer Datenanalyse untersucht. In Abbildung 11 wurden die normalisierten Mittelwerte der Wasserkontrolle mit denen der Versuchsgruppen nach Stimulation mit 100, 250, 360 und 1000 ng/ml TNF- $\alpha$  verglichen. Zwischen der Wasserkontrolle und 100 und 250ng/ml besteht kein signifikanter Unterschied ( $p=0,220$  bzw.  $p=0,106$ ). Zwischen der Wasserkontrolle und 360 und 1000 ng/ml besteht ein hochsignifikanter Unterschied ( $p\leq 0,01$  bzw.  $p\leq 0,01$ ; s. Abbildung 11).

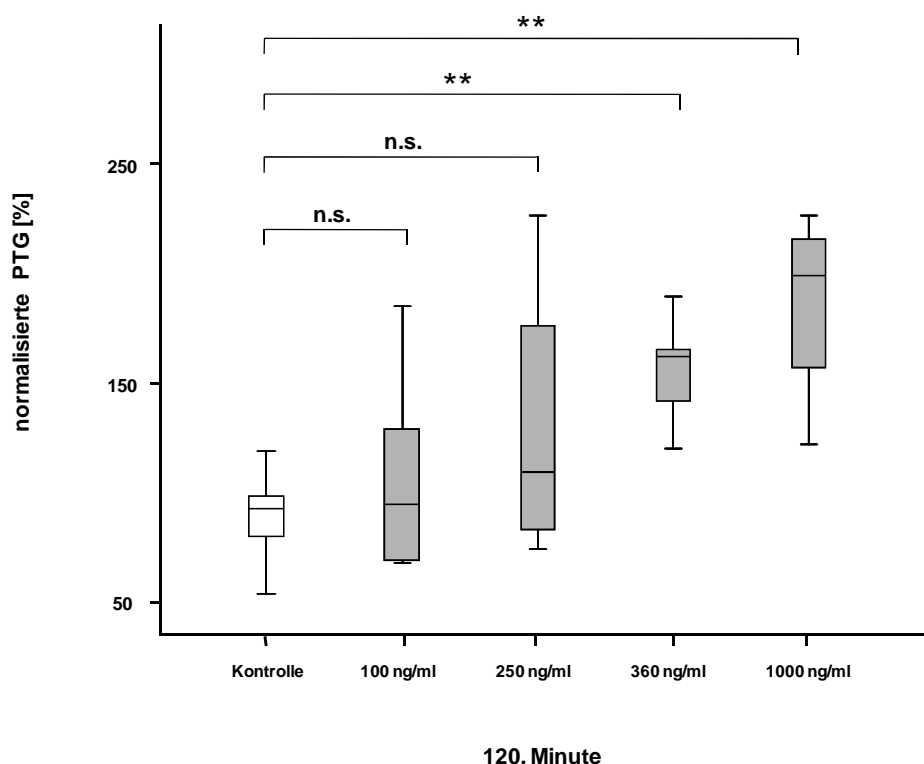


Abbildung 11: Dosisabhängige Erhöhung der PTG durch TNF- $\alpha$

Dargestellt wurde die normalisierte PTG 60 Minuten nach Zugabe von 100 (n=9), 250 (n=3), 360 (n=5) oder 1000 (n=5) ng/ml TNF- $\alpha$  (graue Boxplots) und der Kontrolle (Wasser, n=8; weißer Boxplot). Die normalisierte PTG zwischen der Kontrolle und der Zugabe von 100 oder 250 ng/ml TNF- $\alpha$  war nicht erhöht ( $p=0,220$  bzw.  $p=0,106$ ). Die normalisierte PTG zwischen der Kontrolle und der Zugabe von 360 oder 1000 ng/ml TNF- $\alpha$  war erhöht.  $**p\leq 0,01$ , n.s.=nicht signifikant, Mann-Whitney-U-Test. Die Boxplots stellen den Median, die 25. und 75. Perzentile dar, darüber hinaus auch den maximalen und minimalen Messwert.



### 3.1.2 Zilienschlagfrequenz unter Exposition von TNF- $\alpha$

Für die Messung der ZSF wurden fünf Versuche durchgeführt, denen jeweils 360 ng/ml TNF- $\alpha$  appliziert wurde. Der Mittelwert der Baseline betrug  $8,8 \pm 1,4$  Hz. 39 Minuten nach Stimulation mit 360 ng/ml TNF- $\alpha$  betrug der Mittelwert  $13,6 \pm 5,2$  Hz und nach 60 Minuten  $23,1 \pm 6,8$  Hz. Es wurde eine signifikante Erhöhung der ZSF 60 Minuten nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  festgestellt ( $p \leq 0,01$ , Abbildung 12).

Um zu kontrollieren, dass die Erhöhung der ZSF nicht durch die Volumenzunahme des Puffers stimuliert wurde, wurden Versuche mit Zugabe von Aqua dest. anstelle von TNF- $\alpha$  durchgeführt. Aqua dest. (Volumina 2-20  $\mu$ l) wurde dem Organbad zum gleichen Zeitpunkt wie TNF- $\alpha$  zugegeben. Der Mittelwert der Baseline betrug in dieser Reihe  $12,9 \pm 3,0$  Hz ( $n=5$ ) und nach 39 Minuten  $14,4 \pm 4,5$  Hz und nach 60 Minuten  $14,6 \pm 2,5$  Hz ( $p=0,294$  und  $p=0,061$ ). Es lag keine signifikante Veränderung vor.

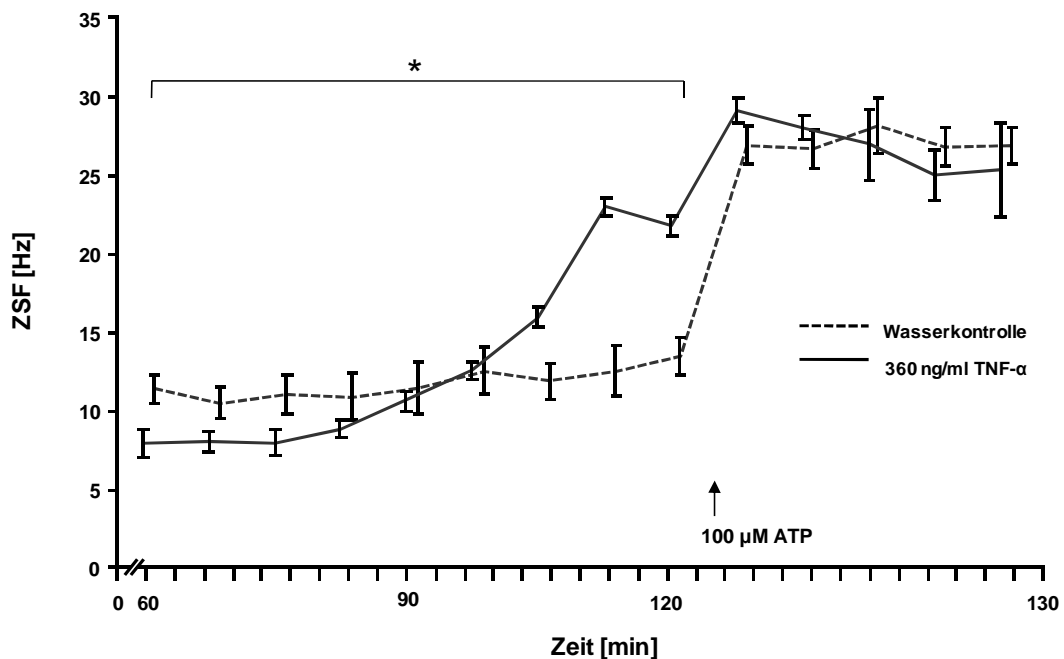


Abbildung 12: TNF- $\alpha$  steigert die ZSF im Vergleich zur Kontrolle.

60 Minuten nach Applikation von 360 ng/ml TNF- $\alpha$  (schwarze Linie) kam es zu einem signifikanten Anstieg der ZSF im Vergleich zur Wasserkontrolle ohne TNF- $\alpha$  ( $p=0,061$ , gestrichelte Linie; Signifikanz nicht eingezeichnet). Dargestellt ist der MW und der SEM,  $*p \leq 0,05$ ,  $n=5$ , Two-way ANOVA.

Die TNF- $\alpha$  induzierte Erhöhung der ZSF korrelierte stark mit der beobachteten Erhöhung der PTG nach Exposition mit 360 ng/ml TNF- $\alpha$ . Die Werte der Versuche der ZSF und PTG nach Stimulation mit 360 ng/ml TNF- $\alpha$  wurden mittels eines Pearson-Tests untersucht. Es zeigte sich, dass der Korrelationskoeffizient positiv

war (s. Abbildung 13). Dies zeigte, dass mit der Stimulation der ZSF durch TNF- $\alpha$  parallel eine Stimulation der PTG einher geht. In diesem Kapitel konnte außerdem gezeigt werden, dass die Erhöhung der PTG unter Exposition von TNF- $\alpha$  dosisabhängig war. Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob diese beobachtete Stimulation von den Rezeptoren TNF-R1 oder TNF-R2 vermittelt wurde.

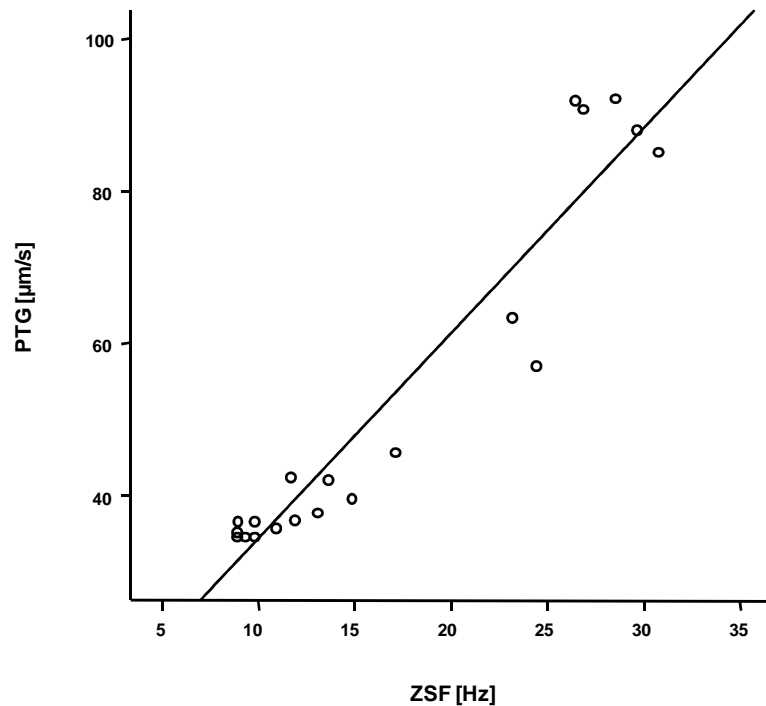


Abbildung 13: Korrelation zwischen ZSF und PTG für 360 ng/ml TNF- $\alpha$ . Die PTG korrelierte stark mit dem Anstieg der ZSF, dies indizierte der Korrelationskoeffizient von  $r=0,908$ , jeweils  $n=5$ .

### 3.1.3 Expression von TNF-Rezeptoren

Die Rezeptoren TNF-R1 und TNF-R2 sind hauptsächlicher Bindungspartner von TNF- $\alpha$  und werden von vielen Zellen exprimiert. Um zu ermitteln, ob die TNF- $\alpha$  induzierte Erhöhung von TNF-R1 und TNF-R2 abhängig war, wurde zuerst untersucht, ob murine Tracheen die Rezeptoren TNF-R1 und R2 exprimieren. Die Expression der Rezeptoren TNF-R1 und R2 in murinen Tracheen wurden mittels PCR und qPCR untersucht. Aus drei Tracheen inkubiert in HEPES sowie aus drei Tracheen inkubiert in HEPES und TNF- $\alpha$  (für 60 Minuten) wurde mRNA isoliert. Nach erfolgtem Umschreiben der mRNA in cDNA wurde die PCR durchgeführt. Die mit TNF- $\alpha$  inkubierten Tracheen zeigten für den TNF-R1 Rezeptor in der Gelelektrophorese ein stärkeres Signal im Vergleich zu den Tracheen, die ohne

TNF- $\alpha$  inkubiert wurden. Für den TNF-R2 Rezeptor konnte sowohl für die Tracheen mit Inkubation und ohne Inkubation von TNF- $\alpha$  kein Signal detektiert werden (Abbildung 14).

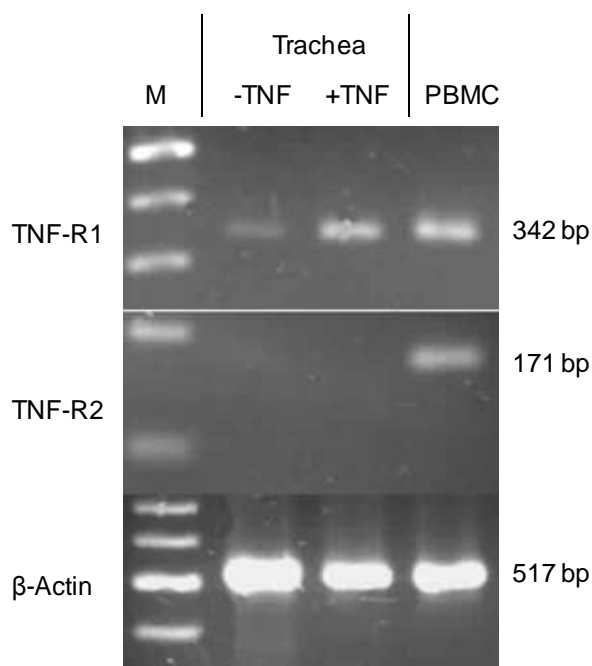


Abbildung 14: Gelelektrophorese der PCR-Produkte von TNF-R

Das Signal des Rezeptor TNF-R1 schien nach Applikation mit TNF- $\alpha$  (+TNF, n=3) stärker zu sein als das Signal ohne TNF- $\alpha$  (-TNF, n=3) (Inkubationszeit jeweils 60 Minuten). TNF-R2 mRNA war in beiden Fällen nicht nachweisbar. Isolierte Leukozyten (PBMC, n=1) aus Mäusen exprimierten sowohl TNF-R1 als auch R2. Als Positivkontrolle war in allen drei Fällen (-TNF, +TNF, PBMC) das Housekeeping-Gen  $\beta$ -Actin exprimiert (M = Basenmarkerpaare).

Die extrahierte mRNA aus drei genuinen Tracheen zeigte in der durchgeführten qPCR eine 6,25fach höhere Expression für TNF-R1 (0,18) relativ zum Housekeepinggen Slc25 als TNF-R2 (0,035; Abbildung 15). In der gezeigten Gelelektrophorese wurde das PCR-Produkt einer Trachea nach erfolgter qPCR mit minus RT-Kontrolle aufgetragen. Die PCR-Produkte lagen bei 342 bp (TNF-R2) und 171 bp (TNF-R1; Abbildung 16).

### 3 Ergebnisse

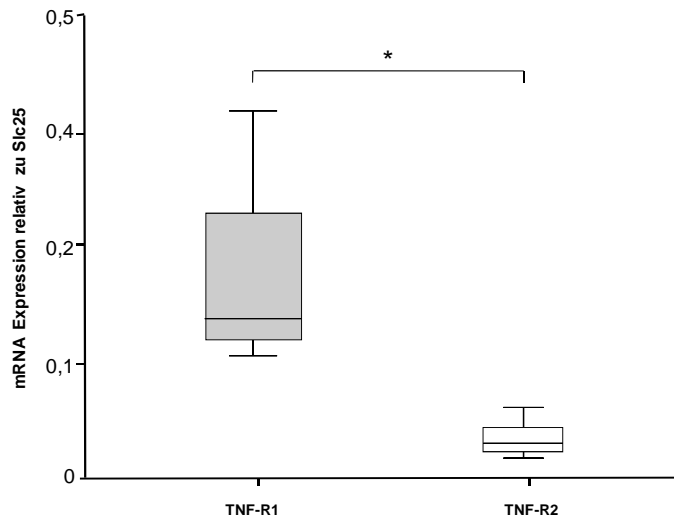


Abbildung 15: Stärkere Expression von TNF-R1 als TNF-R2

Die mRNA von TNF-R1 war signifikant stärker exprimiert als die des TNF-R2, für dieses Vergleichen wurden beide zuerst in das Verhältnis zu dem Housekeeping-Gen Slc25 (y-Achse) gesetzt. Die Experimente wurden an drei genuine murinen Tracheen durchgeführt.  $*p \leq 0,05$ . Die Boxplots stellen den Median, die 25. und 75. Perzentile dar, darüber hinaus auch den maximalen und minimalen Messwert.

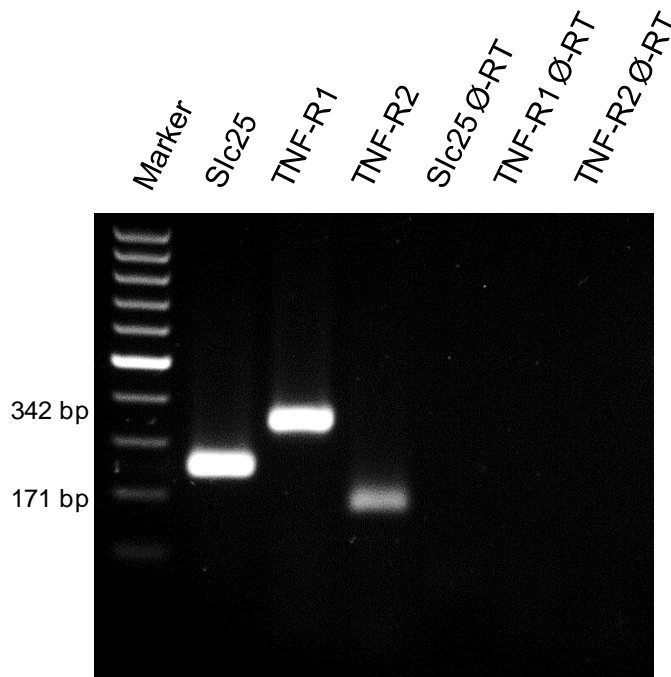


Abbildung 16: Gelelektrophorese der qPCR-Produkte von TNF-R1 und TNF-R2

Die Gelelektrophorese zeigte die Signale von TNF-R1 (342bp) und TNF-R2 (172bp) nach erfolgreicher qPCR von einer genuine murinen Trachea. Weiterhin waren ein 100 bp Marker, das Housekeepinggen Slc25, TNF-R1 (342 bp) sowie die Kontrollen ohne vorheriger RT von TNF-R1 und R2 aufgetragen (n=1).

### **3.1.4 Partikeltransportgeschwindigkeit unter Inhibition des TNF-Rezeptors 1**

Mittels Antikörper konnten in der Vergangenheit spezifische Rezeptoren inhibiert werden. Aufgrund dessen wurde eine Versuchsreihe mit dem Antikörper anti-Maus CD 120 a durchgeführt. Es ist ein spezifischer Antikörper gegen TNF-R1. Da Dynabeads auch Antikörper und IgG binden konnten, wurden diese mit IgM gesättigt und danach mit den gesättigten Dynabeads die PTG bestimmt. Jedoch war zu beobachten, dass auch die gesättigten Dynabeads nicht optimal transportiert wurden. Nach Ausschluss anderer Fehlerquellen wurde die Versuchsreihe abgeschlossen.

Damit der Antikörper anti-Maus CD 120 a und dessen Kontrolle mit armenischen Hamster IgG an den TNF-R1-Rezeptor binden konnte, wurden die Tracheen nach der Präparation für eine Stunde vor Zugabe von 360 ng/ml TNF- $\alpha$  inkubiert. Die Applikation von TNF- $\alpha$  erfolgte zwischen der 90. und der 93. Minute. In den Versuchen mit 25  $\mu$ g/ml anti-Maus CD 120 a war nach 39 und 60 Minuten ( $p \leq 0,05$  bzw.  $p \leq 0,05$ ) nach Applikation von TNF- $\alpha$  ein signifikanter Anstieg der PTG im Vergleich zu Minute 90 zu beobachten ( $n=6$ ). Der Mittelwert dieser Versuche betrug in Minute 90  $36,3 \pm 8,5 \mu\text{m/s}$ , in Minute 129  $46,1 \pm 6,8 \mu\text{m/s}$  und in Minute 150  $61,8 \pm 15,9 \mu\text{m/s}$ . In den Versuchen mit 25  $\mu$ g/ml armenischer Hamster IgG war nach 39 und 60 Minuten ( $p=0,057$  bzw.  $p=0,223$ ) nach Applikation von TNF- $\alpha$  kein signifikanter Anstieg der PTG im Vergleich zu Minute 90 zu beobachten ( $n=5$ ). Der Mittelwert dieser Versuche betrug in Minute 90  $29,8 \pm 6,8 \mu\text{m/s}$ , in Minute 129  $44,4 \pm 17,1 \mu\text{m/s}$  und in Minute 150  $44,1 \pm 26,4 \mu\text{m/s}$  (s. Abbildung 17 und Abbildung 18).

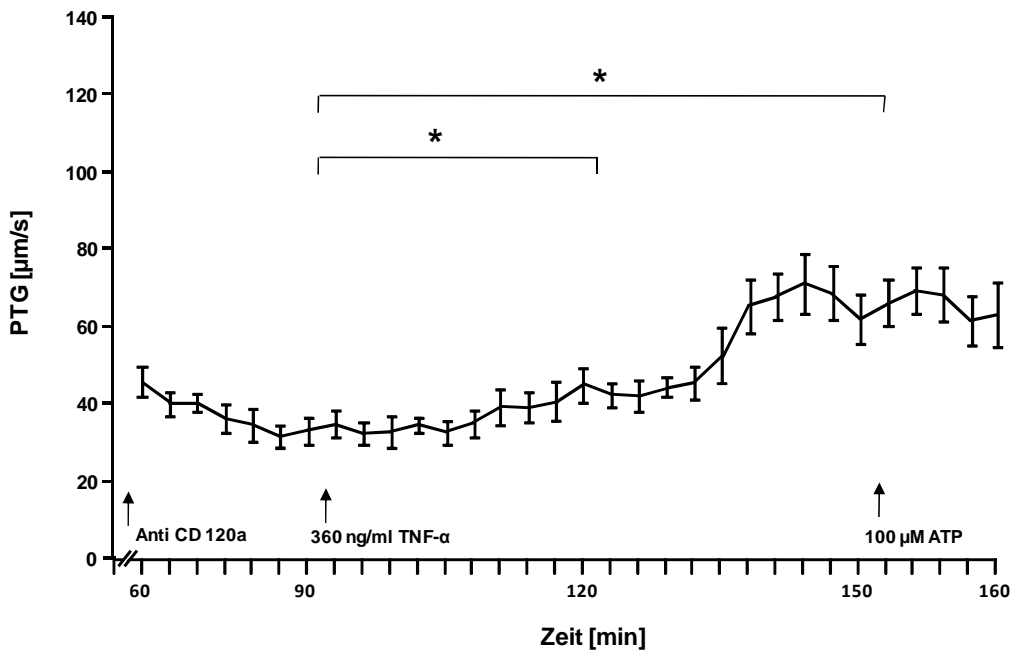


Abbildung 17: Der Antikörper anti-Maus CD 120 a unterdrückt nicht die TNF- $\alpha$  induzierte Steigerung der PTG

Die Blockierung des TNF-R1 mit 25  $\mu\text{g/ml}$  anti-Maus CD 120 a unterdrückte nicht den stimulierenden Effekt von 360 ng/ml TNF- $\alpha$  auf die PTG. Es kam zu einem Anstieg der PTG nach 39 Minuten und nach 60 Minuten nach Applikation von TNF- $\alpha$ . Dargestellt ist der MW und der SEM, \* $p \leq 0,05$ ,  $n=6$ , Two-way ANOVA.

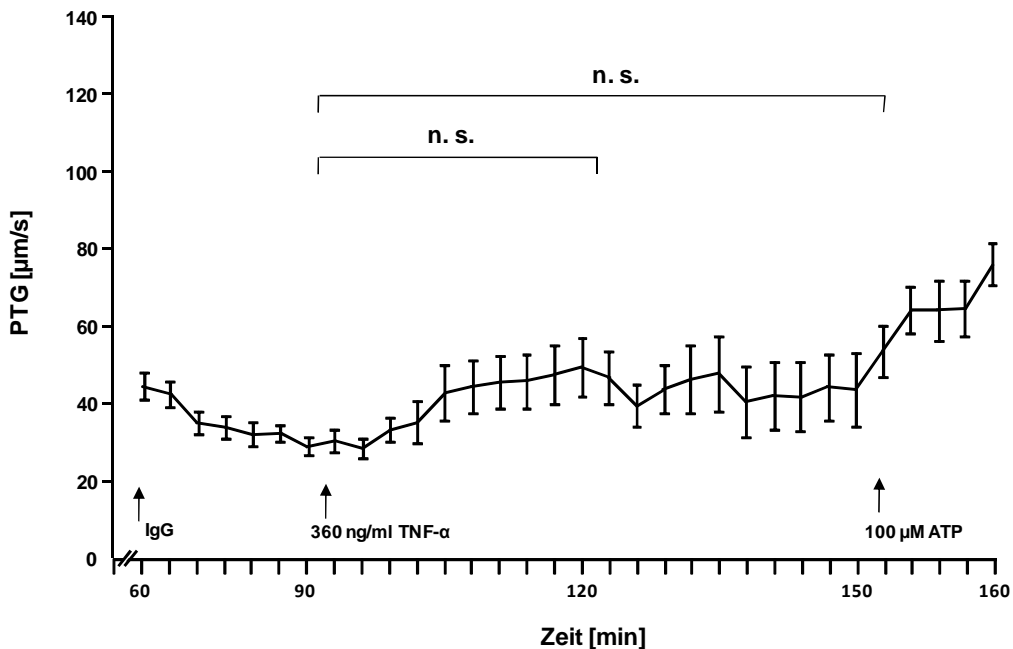


Abbildung 18: Der Einfluss von IgG und TNF- $\alpha$  auf die PTG

Es wurde 25  $\mu\text{g/ml}$  armenischer Hamster IgG dem Organbad zugefügt und in Minute 90 360 ng/ml TNF- $\alpha$  appliziert. Es kam zu keinem Anstieg der PTG nach 39 Minuten und nach 60 Minuten nach Applikation mit TNF- $\alpha$  ( $p=0,057$  bzw.  $p=0,223$ ). Dargestellt ist der MW und der SEM, n.s.=nicht signifikant,  $n=5$ , Two-way ANOVA.

### 3.1.5 Zilienschlagfrequenz von TNF-R1<sup>-/-</sup> und Bl6J Mäusen unter Exposition von TNF- $\alpha$

Die ZSF wurde an jeweils 4 Tracheen von TNF-R1<sup>-/-</sup> Mäusen nach Applikation von 360 oder 1000 ng/ml TNF- $\alpha$  bestimmt. Da dieser Mausstamm einen J-Hintergrund anstelle eines N-Hintergrundes hatte, wurde die gleiche Versuchsreihe mit C57/Bl6 J Mäusen als Kontrolle durchgeführt.

Der Mittelwert der Baseline der TNF-R1<sup>-/-</sup> Mäuse betrug nach Applikation von 360 ng/ml 11,0 $\pm$ 1,0 Hz. Nach 39 Minuten erhöhte sich die ZSF auf 18,8 $\pm$ 7,1 und nach 60 Minuten auf 16,4 $\pm$ 6,2 Hz. Keine dieser Erhöhungen war signifikant zur Baseline ( $p=0,088$  bzw.  $p=0,453$ ). Bei den C57/Bl6 J Mäusen zeigte sich für die Konzentration von 360 ng/ml TNF- $\alpha$  nach 39 und 60 Minuten eine hochsignifikante Erhöhung der ZSF ( $p\leq 0,05$  und  $p\leq 0,05$ ). Der Mittelwert der Baseline betrug für 360 ng/ml 11,5 $\pm$ 1,3 Hz und für die 99. Minute 24,5 $\pm$ 2,7 Hz und für die 120. Minute 17,1 $\pm$ 6,8 Hz. (Kurvenverläufe nicht dargestellt). In Abbildung 19 wurde der Kurvenverlauf der PTG der TNF-R1<sup>-/-</sup> und der C57/Bl6 J Mäuse dargestellt nach Applikation von 1000 ng TNF- $\alpha$ . Nach 60 Minuten war eine hochsignifikante Erhöhung der ZSF bei den C57/Bl6 J Mäusen ( $p\leq 0,01$ ) im Gegensatz zu den TNF-R1<sup>-/-</sup> Mäusen zu beobachten ( $p=0,260$ ). Die Mittelwerte der TNF-R1<sup>-/-</sup> Mäusen betragen für die Baseline 13,2 $\pm$ 4,2 Hz, nach 39 Minuten 13,9 $\pm$ 1,7 Hz und nach 60 Minuten 16,1 $\pm$ 2,2 Hz. Die Mittelwerte der C57/Bl6 J Mäusen betragen für die Baseline 10,5 $\pm$ 1,5 Hz, nach 39 Minuten 17,4 $\pm$ 6,8 Hz und nach 60 Minuten 23,0 $\pm$ 1,4 Hz.

Um zu kontrollieren, ob der Anstieg durch eine Volumenzunahme bedingt war, wurde für beide Stämme (jeweils  $n=4$ ) Wasser anstelle von TNF- $\alpha$  ins Organbad gegeben. Der Mittelwert der Baseline der TNFR1<sup>-/-</sup> Mäuse betrug hier 10,1 $\pm$ 1,1 Hz und der Mittelwert der C57/Bl6J 11,5 $\pm$ 1,7 Hz. Nach 39 Minuten betrug der Mittelwert bei den TNF-R1<sup>-/-</sup> Tieren 14,2 $\pm$ 3,2 Hz und der MW der J-Tiere 14,4 $\pm$ 1,7 Hz ( $p=0,066$  bzw.  $p\leq 0,01$ ). Nach 60 Minuten betragen die Mittelwerte für die TNFR1<sup>-/-</sup> Mäuse 15,9 $\pm$ 1,1 Hz und für die C57/Bl6J Mäuse 19,1 $\pm$ 4,5 Hz ( $p\leq 0,01$  bzw.  $p=0,057$ , Kurvenverläufe nicht dargestellt).

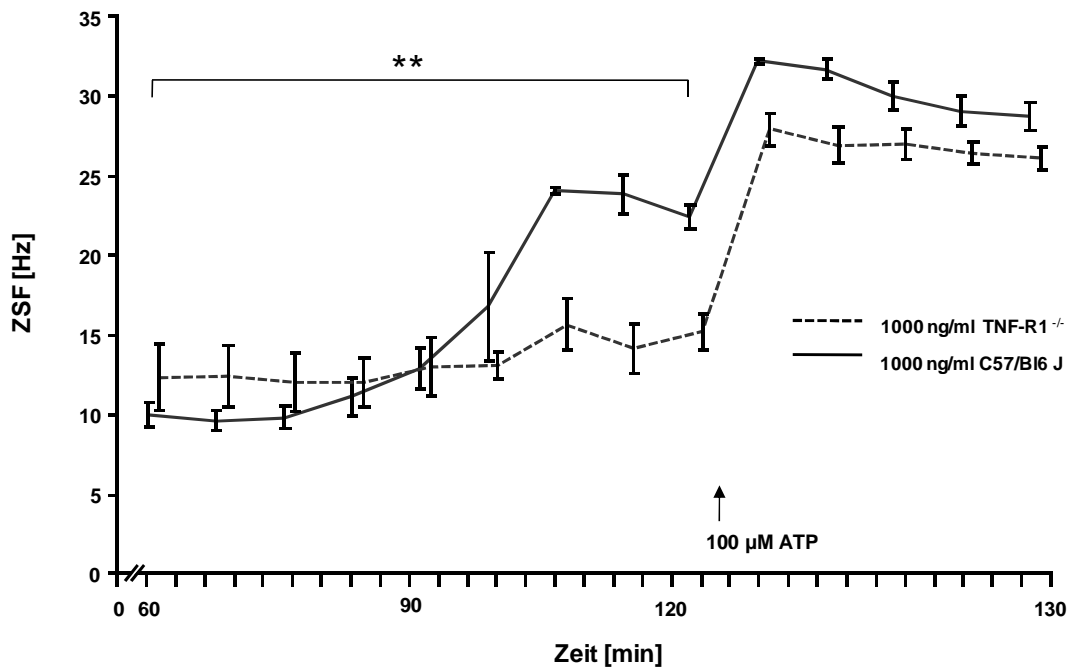


Abbildung 19: TNF- $\alpha$  induziert nicht den Anstieg der ZSF bei TNF-R1<sup>-/-</sup> Mäusen  
 Dem Organbad der TNF-R1<sup>-/-</sup> und der C57/B16 J Mäuse wurden jeweils 1000 ng/ml TNF- $\alpha$  appliziert. Es wurde ein Anstieg der ZSF 60 Minuten nach Applikation mit TNF- $\alpha$  bei den C57/B16 J Mäusen (schwarze Linie) beobachtet, jedoch kein Anstieg der ZSF bei den TNF-R1<sup>-/-</sup> Mäusen ( $p=0,206$ , gepunktete Linie). Dargestellt ist der MW und der SEM.  $**p\leq 0,01$ ,  $n=5$ , Two-way ANOVA.

Um die ZSF des TNF-R1<sup>-/-</sup> Mausstamms und dessen korrespondierenden Mausstamm miteinander zu vergleichen, wurden die Mittelwerte der 60. und 120. Minute der Versuche mit 360 ng/ml oder 1000 ng/ml TNF- $\alpha$  ( $p\leq 0,05$  bzw.  $p\leq 0,05$ ) miteinander verglichen. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der ZSF der C57/B16 J Mäuse. Für die ZSF des TNF-R1<sup>-/-</sup> Mausstamms beider Konzentrationen war kein signifikanter Unterschied der ZSF zwischen der 60. und 120. Minute zu beobachten ( $p=0,453$  bzw.  $p=0,701$ ; s. Abbildung 20).



### 3 Ergebnisse

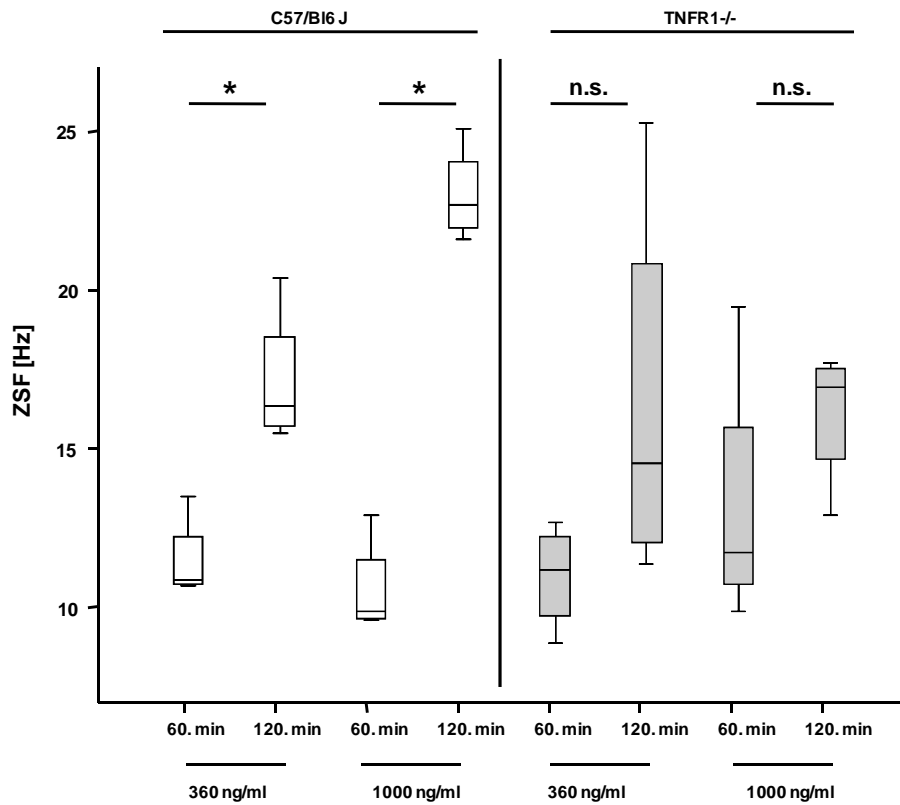


Abbildung 20: TNF- $\alpha$  erhöht die PTG über den TNF-R1

Dargestellt sind die ZSF in der 60. Minute und in der 120. Minute nach Applikation von 360 oder 1000 ng/ml TNF- $\alpha$  bei C57/B16 J Mäusen (weiße Boxplots; n=4) und TNF-R1<sup>-/-</sup> Mäusen (graugepunktete Boxplots; n=4). In der Gruppe der C57/B16- Mäuse bestand ein signifikanter Unterschied. In der Gruppe der TNF-R1<sup>-/-</sup> Mäusen bestand kein Unterschied (p=0,453 bzw. p=0,701). n.s. = nicht signifikant, \*p $\leq$ 0,05, Mann-Whitney-U-Test. Die Boxplots stellen den Median, die 25. und 75. Perzentile dar, darüber hinaus auch den maximalen und minimalen Messwert.

## 3.2 Die Überprüfung von Transduktionskaskaden unter Exposition von TNF- $\alpha$

### 3.2.1 Partikeltransportgeschwindigkeit unter Inhibition der NO-Synthasen

Um zu überprüfen, ob durch die Inhibition der NOS der stimulierende Effekt durch TNF- $\alpha$  unterdrückt werden konnte, wurden N $\omega$ -Nitro-L-Arginin-Methyl-Ester-Hydrochlorid (L-NAME) oder L-NG-Monomethyl-Arginin-Citrat (L-NMMA), die unspezifische NOS-Inhibitoren sind, verwendet. Indem HEPES-Pufferwaren diese mit einer Konzentration von 100  $\mu$ M gelöst, worin die Tracheen ab Beginn des Organbads inkubiert wurden. Nach Erreichen der Baseline wurde diesem Organbad 360 ng/ml TNF- $\alpha$  zugefügt. Als Kontrolle wurde für jeweils vier Tracheen kein TNF- $\alpha$  zugefügt.

Die Gruppe, die mit L-NAME inhibiert und mit TNF- $\alpha$  stimuliert wurde, zeigte in der 99. Minute einen signifikanten Anstieg und in der 120. Minute keinen signifikanten Anstieg der PTG. Die Gruppe, die nicht stimuliert wurde, zeigte keinen signifikanten Anstieg. Der Mittelwert der Baseline der ersten Gruppe (TNF- $\alpha$  und L-NAME) betrug  $33,7 \pm 15,6$   $\mu$ m/s und der zweiten Gruppe (L-NAME)  $38,3 \pm 18,7$   $\mu$ m/s. Danach stieg der Messwert der ersten Gruppe nach 39 Minuten auf  $42,8 \pm 15,6$   $\mu$ m/s ( $p \leq 0,05$ ) und nach 60 Minuten auf  $51,2 \pm 28,9$   $\mu$ m/s ( $p = 0,087$ ) an. Die Mittelwerte der Gruppe, die nur mit L-NAME stimuliert wurde, betrugen nach 39 Minuten  $42,8 \pm 24,8$   $\mu$ m/s ( $p = 0,194$ ) und nach 60 Minuten  $49,6 \pm 26,9$   $\mu$ m/s ( $p \leq 0,05$ ).

Der Mittelwert der Baseline der Gruppe mit TNF- $\alpha$  und L-NMMA betrug  $38,3 \pm 10,5$   $\mu$ m/s und der der Gruppe mit L-NMMA  $42,7 \pm 10,7$   $\mu$ m/s. Danach stieg der Mittelwert der ersten Gruppe nach 39 Minuten auf  $52,1 \pm 7,2$   $\mu$ m/s und nach 60 Minuten auf  $85,8 \pm 13,8$   $\mu$ m/s an ( $p \leq 0,05$  bzw.  $p \leq 0,05$ ). Die Mittelwerte der Gruppe, die nur mit L-NMMA stimuliert wurde, betrugen nach 99 Minuten  $42,9 \pm 11,0$   $\mu$ m/s und nach 120 Minuten  $45,2 \pm 8,8$   $\mu$ m/s ( $p = 0,886$  bzw.  $p = 0,320$ ; s. Abbildung 21 und Abbildung 22). Die Gruppe, die mit L-NMMA inhibiert und mit TNF- $\alpha$  stimuliert wurde, zeigte in der 99. und 120. Minute einen signifikanten Anstieg der PTG. Die Gruppe, die nicht stimuliert wurde, zeigte keinen signifikanten Anstieg.

Zusammenfassend konnten beide NOS-Inhibitoren den stimulierenden Effekt von TNF- $\alpha$  auf die PTG nicht unterdrücken. Sowohl für L-NAME als auch für L-NMMA zeigte die alleinige Gabe der NOS-Inhibitoren keinen Effekt auf die PTG.

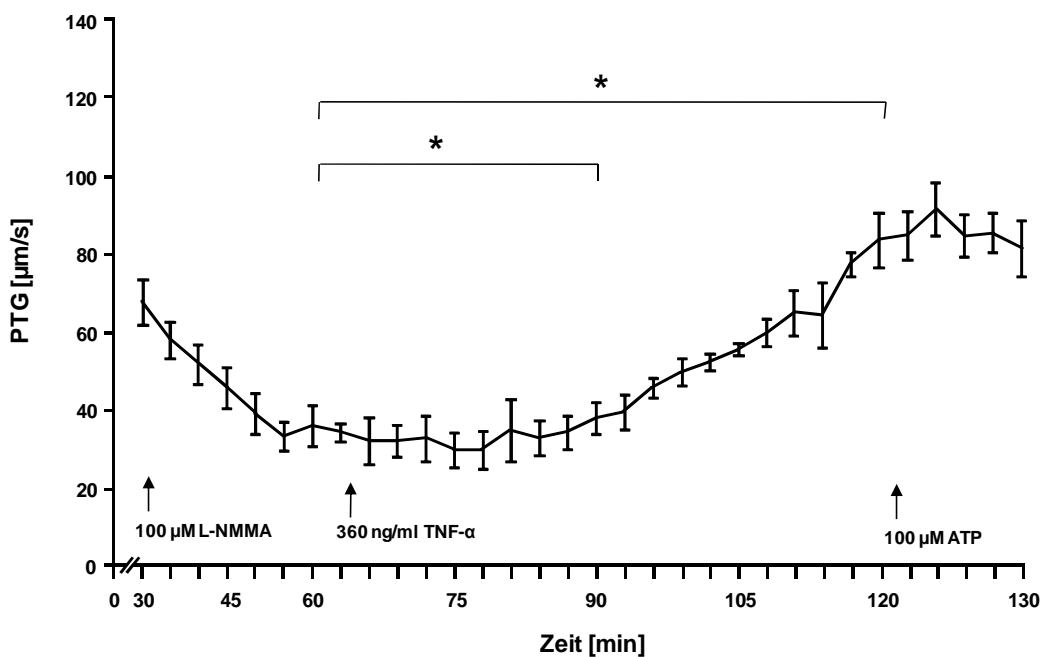


Abbildung 21: L-NMMA beeinflusst nicht den TNF- $\alpha$  induzierten Anstieg der PTG  
 Es wurden 100  $\mu$ M L-NMMA dem Organbad zugefügt und in Minute 60 erfolgte die Applikation von 360 ng/ml TNF- $\alpha$ . Nachfolgend stieg die PTG gemessen in der 39. Minute und in der 60. Minute nach Applikation von TNF- $\alpha$  an. Dargestellt ist der MW und der SEM. \* $p \leq 0,05$ ,  $n=4$ , Two-way ANOVA.

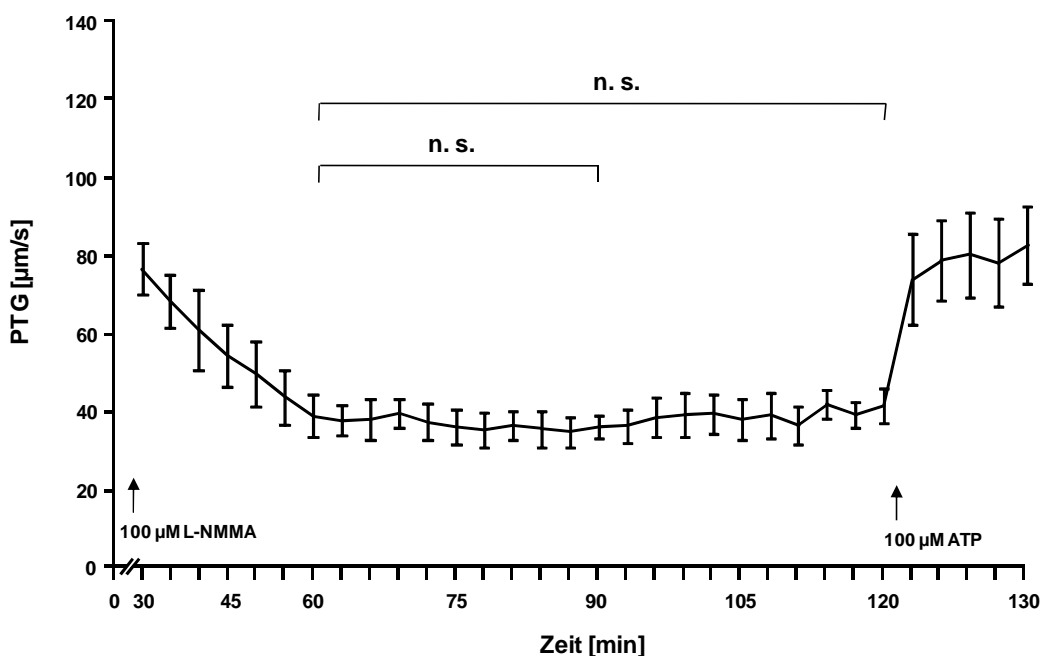


Abbildung 22: L-NMMA verändert nicht die basale PTG  
 Die alleinige Applikation von 100  $\mu$ M L-NMMA veränderte nicht die PTG sowohl nach 39 Minuten ( $p=0,886$ ) als auch nach 60 Minuten ( $p=0,320$ ) gemessen ab der Baseline (60. Minute). Dargestellt ist der MW und der SEM. n.s.=nicht signifikant,  $n=4$ , Two-way ANOVA.

### 3.2.2 Partikeltransportgeschwindigkeit unter Inhibition der muskarinergen Rezeptoren

Atropin, das mit Acetylcholin um die muskarinergen Rezeptoren konkurriert und diese blockiert (kompetitiver Antagonist), wurde direkt in einer Konzentration von  $1 \mu\text{M}$  in HEPES gelöst. So wurden die Tracheen ab Beginn des Organbads mit Atropin inkubiert. In einer Gruppe ( $n=5$ ) wurden nach der 60. Minute  $360 \text{ ng/ml}$  TNF- $\alpha$  und in der anderen Gruppe ( $n=4$ ) kein TNF- $\alpha$  appliziert. Die Gruppe, die mit TNF- $\alpha$  stimuliert wurde, zeigte in der 99. und in der 120. Minute einen signifikanten Anstieg der PTG. Die Gruppe, die nicht stimuliert wurde, zeigte keinen signifikanten Anstieg. Der Mittelwert der Baseline der ersten Gruppe (TNF- $\alpha$  und Atropin) betrug  $34,8 \pm 17,3 \mu\text{m/s}$  und der zweiten Gruppe (Atropin)  $35,7 \pm 9,7 \mu\text{m/s}$ . Danach stieg der Mittelwert der ersten Gruppe nach 39 Minuten auf  $48,1 \pm 24,7 \mu\text{m/s}$  ( $p \leq 0,05$ ) und nach 60 Minuten auf  $45,5 \pm 22,6 \mu\text{m/s}$  ( $p \leq 0,05$ ) an. Die Mittelwerte der Gruppe, die nur mit Atropin stimuliert wurde, betragen nach 99 Minuten bei  $33,7 \pm 7,5 \mu\text{m/s}$  ( $p=0,185$ ) und nach 120 Minuten  $37,5 \pm 7,5 \mu\text{m/s}$  ( $p=0,858$ ; Abbildung 23 und Abbildung 24).

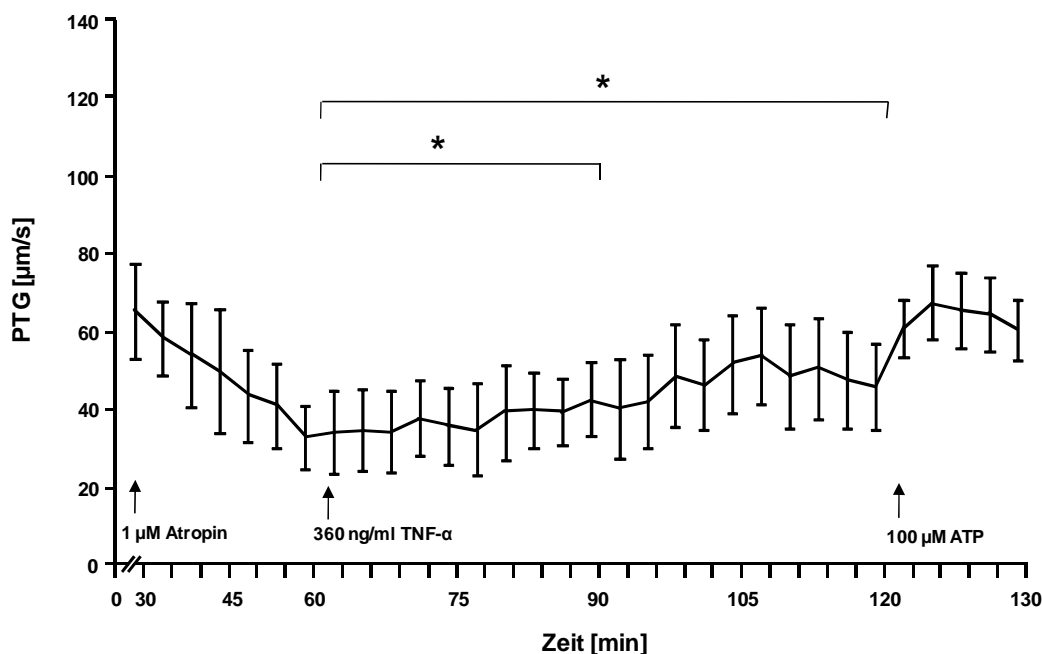


Abbildung 23: Atropin verändert nicht die TNF- $\alpha$  induzierte PTG

Die Applikation von  $1 \mu\text{M}$  Atropin zur Inhibition muskarinergener Rezeptoren verhindert nicht den Anstieg der PTG durch  $360 \text{ ng/ml}$  TNF- $\alpha$ . Dargestellt ist der MW und der SEM. \* $p \leq 0,05$ ,  $n=5$ , Two-way ANOVA.

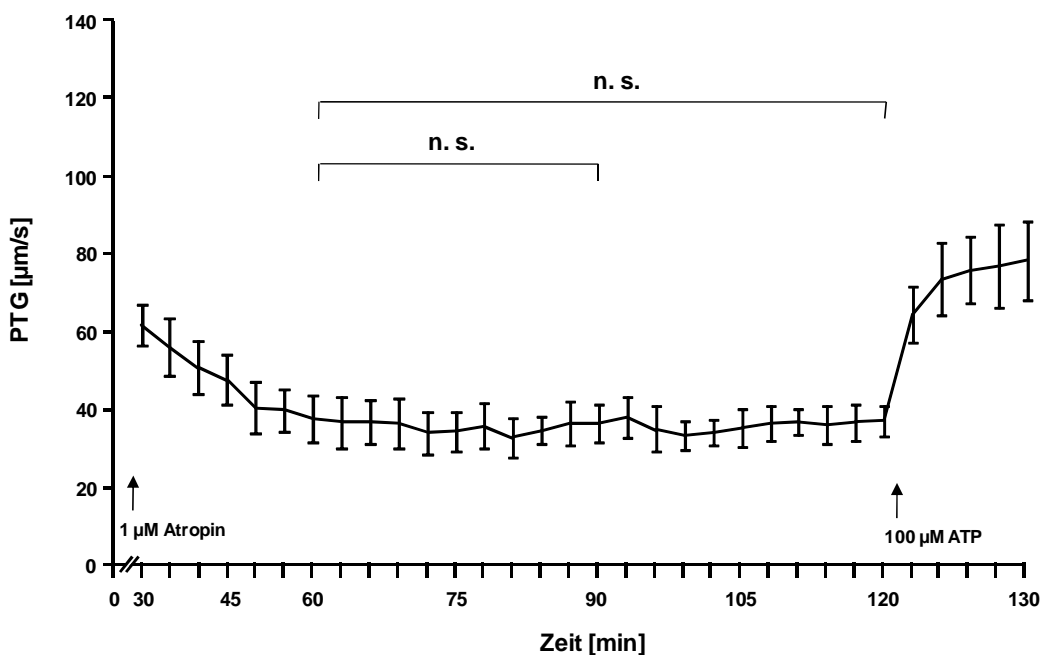


Abbildung 24: Atropin beeinflusst nicht die PTG

Die alleinige Gabe von  $1\mu\text{M}$  Atropin hat keinen Effekt auf die PTG im Beobachtungszeitraum von 39 Minuten ( $p=0,185$ ) bis 60 Minuten ( $p=0,858$ ) nach Erreichen der Baseline (Minute 60). Dargestellt ist der MW und der SEM. n.s.=nicht signifikant,  $n=4$ , Two-way ANOVA.

### 3.2.3 Partikeltransportgeschwindigkeit unter Inhibition von Serotoninrezeptoren

Methysergide, ein Serotoninrezeptor-Antagonist, wurde direkt im HEPES-Puffer mit einer Endkonzentration von  $100\mu\text{M}$  gelöst. So wurden die Tracheen ab Beginn des Organbads mit Methysergide inkubiert. Nach Erreichen der Baseline wurden dem Organbad  $360\text{ ng/ml}$   $\text{TNF-}\alpha$  appliziert. Es konnte weder nach 39 Minuten ( $p=0,868$ ) noch nach 60 Minuten ( $p=0,893$ ) nach der  $\text{TNF-}\alpha$ -Stimulation ein signifikanter Anstieg der PTG gemessen werden ( $n=4$ ). Der Mittelwert der Baseline betrug  $44,5\pm 2,2\mu\text{m/s}$ , in der 99. Minute  $45,1\pm 8,3\mu\text{m/s}$  und in der 120. Minute  $44,0\pm 5,7\mu\text{m/s}$  (s. Abbildung 25). Für die Gruppe, die nur mit Methysergide stimuliert wurde ( $n=2$ ) betrug der Mittelwert der Baseline  $59,4\pm 30,7\mu\text{m/s}$ , ab der 99. Minute  $50,4\pm 27,8\mu\text{m/s}$  ( $p=0,175$ ) und ab der 120. Minute  $52,8\pm 27,0\mu\text{m/s}$  ( $p=0,241$ ). Die Werte zeigten keinen signifikanten Anstieg der PTG (Abbildung 25 und Abbildung 26).

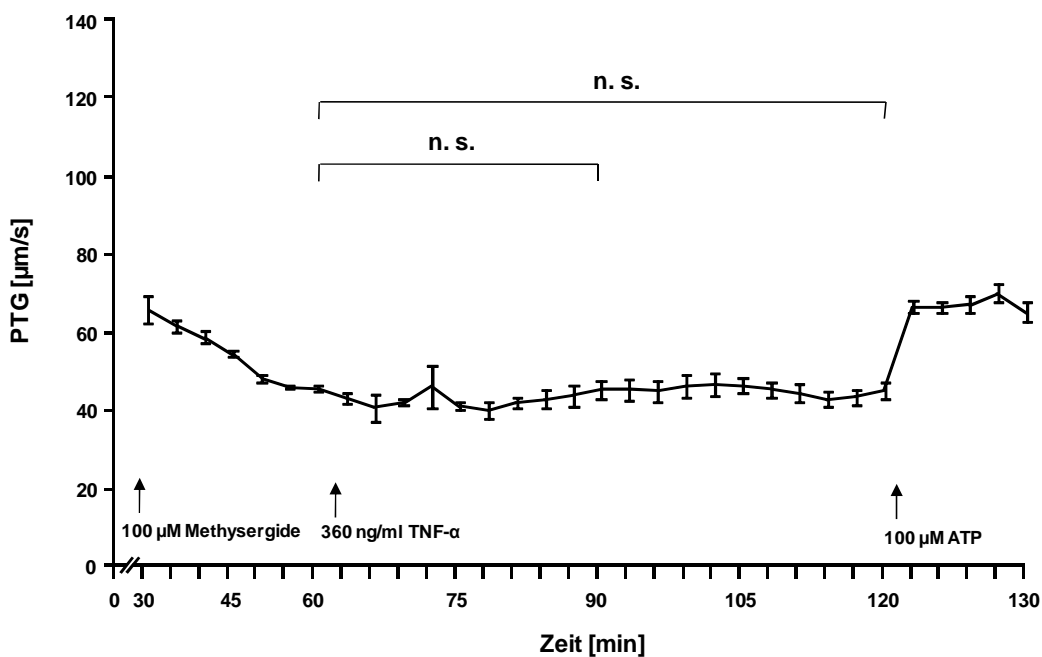


Abbildung 25: Methysergide und TNF- $\alpha$  verändern nicht die PTG

Die Präinkubation der Tracheen mit 100  $\mu\text{M}$  Methysergide blockiert komplett den stimulierenden Effekt von 360 ng/ml TNF- $\alpha$ . Es kam zu keinem Anstieg der PTG nach 39 Minuten und 60 Minuten nach Applikation mit TNF- $\alpha$  ( $p=0,868$  bzw.  $p=0,893$ ). Dargestellt ist der MW und der SEM. n.s.=nicht signifikant,  $n=4$ , Two-way ANOVA.

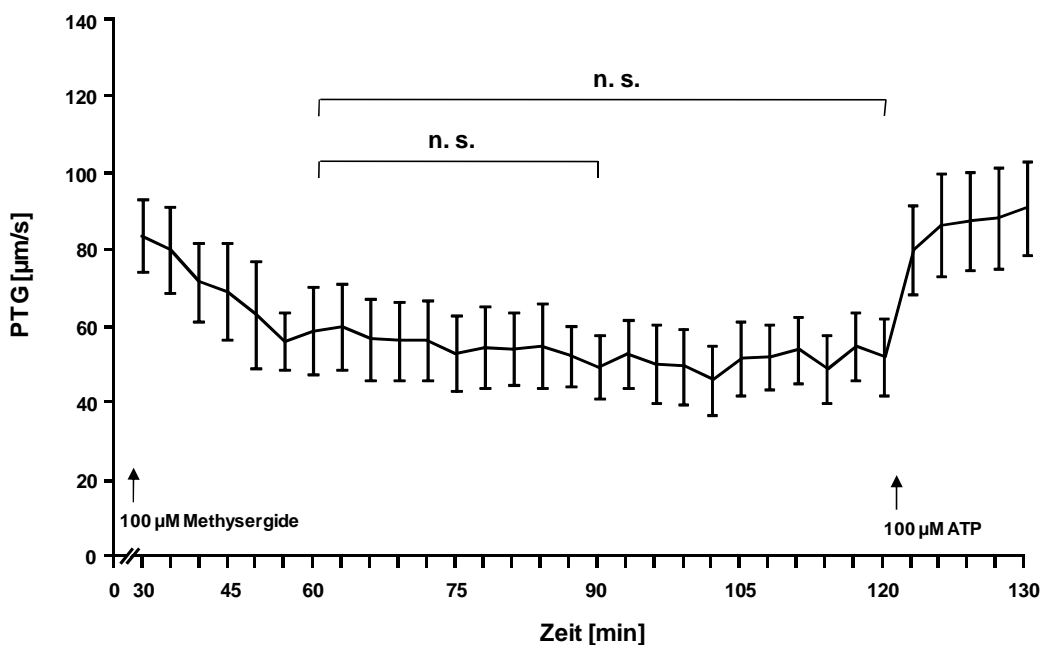


Abbildung 26: Methysergide verändert nicht die Basalrate der PTG

Die alleinige Applikation von 100  $\mu\text{M}$  Methysergide beeinflusst nicht die PTG gemessen nach 39 Minuten ( $p=0,175$ ) und nach 60 Minuten ( $p=0,241$ ) ab der Baseline (Minute 60). Dargestellt ist der MW und der SEM. n.s.=nicht signifikant,  $n=2$ , Two-way ANOVA.

In der Abbildung 27 wurden zusammenfassend die Mittelwerte der 120. Minute der verwendeten Inhibitoren der verschiedenen Signalkaskaden im Vergleich zur Wasserkontrolle und der durch TNF- $\alpha$  induzierten Erhöhung der PTG dargestellt. Die Mittelwerte der Wasserkontrolle wurden jeweils mit denen aus den Versuchen mit 360 ng/ml TNF- $\alpha$  ( $p \leq 0,01$ ), 1  $\mu$ M Atropin und 360 ng/ml TNF- $\alpha$  ( $p \leq 0,05$ ), 100  $\mu$ M L-NAME und 360 ng/ml TNF- $\alpha$  ( $p \leq 0,05$ ), 100  $\mu$ M L-NMMA und 360 ng/ml TNF- $\alpha$  ( $p \leq 0,01$ ) und 100  $\mu$ M Methysergide und 360 ng/ml TNF- $\alpha$  ( $p = 0,166$ ) verglichen. Zusammenfassend konnte beobachtet werden, dass die Erhöhung der PTG durch TNF- $\alpha$  nur durch Methysergide unterdrückt werden konnte im Gegensatz zu den NOS-Inhibitoren L-NAME und L-NMMA und Atropin, dem kompetitiven Antagonist der muskarinergen Rezeptoren.

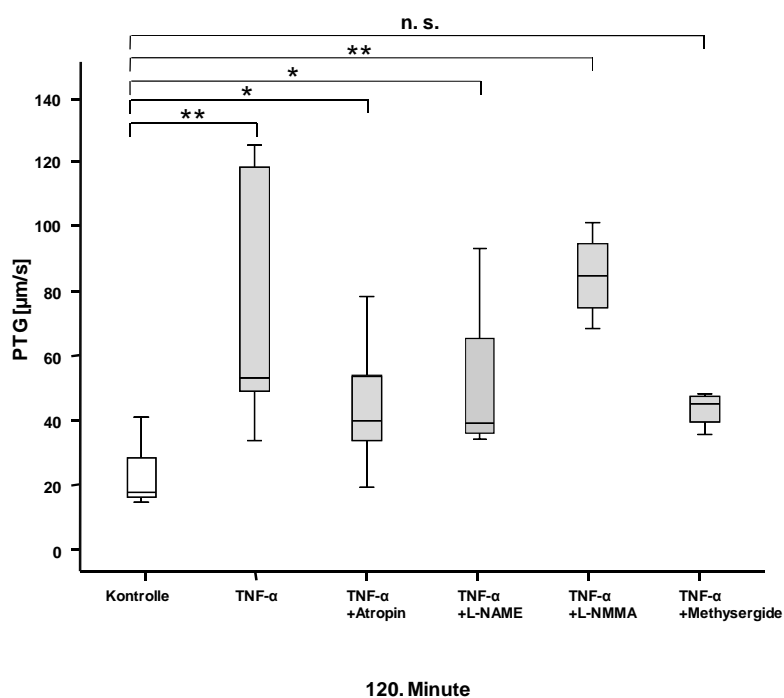


Abbildung 27: Zusammenfassende Darstellung der Experimente mit pharmakologischen Inhibitoren. Die Boxplots illustrierten die PTG 60 Minuten nach Zugabe von 360ng/ml TNF- $\alpha$  ( $n=5$ ; graue Boxplot) und der Kontrolle ( $n=8$ ; weißer Boxplot), 1  $\mu$ M Atropin und 360 ng/ml TNF- $\alpha$ ; 100  $\mu$ M L-NAME und 360 ng/ml TNF- $\alpha$ ; L-NMMA und 360 ng/ml TNF- $\alpha$ ; 100 $\mu$ M Methysergide und 360 ng/ml TNF- $\alpha$  (jeweils  $n=4$ ). Zwischen der Kontrolle und TNF- $\alpha$  und L-NMMA mit TNF- $\alpha$  lag ein hochsignifikanter Unterschied vor. Nur TNF- $\alpha$  mit Methysergide zeigte keinen signifikanten Unterschied zu Wasser ( $p=0,166$ ). Zwischen L-NAME, Atropin mit TNF- $\alpha$  und der Kontrolle war ein signifikanter Unterschied. n.s.= nicht signifikant, \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ , Mann-Whitney-U-Test. Die Boxplots stellen den Median, die 25. und 75. Perzentile dar, darüber hinaus auch den maximalen und minimalen Messwert.



## 4 Diskussion

### 4.1 Der Einfluss von TNF- $\alpha$ auf das Flimmerepithel der Trachea der adulten Maus

Die mukoziliäre Clearance gehört zu den angeborenen Verteidigungsmechanismen der Trachea. Sie ist eine grundlegende Funktion des Flimmerepithels der unteren Atemwege und dient zum Abtransport und Inaktivierung von Pathogenen und Schadstoffen. Zum einen bildet das Flimmerepithel einen zweischichtigen Flüssigkeitsfilm, worauf die oberste Schicht -der Mukus- Partikel auffängt, und zum anderen reinigt das Epithel mittels mechanischen Transport die unteren Atemwege. Dieser mechanische Transport wird durch die zilienträgenden Zellen des Flimmerepithels bewerkstelligt. Es ist die Voraussetzung für die mukoziliäre Clearance auf der die koordinierte Reinigung der unteren Atemwege basiert. Die Einflussfaktoren auf die ziliäre Tätigkeit und so der Abwehrfunktion des Flimmerepithels sind mannigfaltig und noch nicht ganz verstanden. Zur Untersuchung dieses mechanischen Teils der mukoziliären Clearance wurde hier die Methode der Messung der PTG und der ZSF verwendet. Diese Arbeit untersuchte stellvertretend am Hauptentzündungsmediator TNF- $\alpha$  den Einfluss von immunologischen Triggern auf die ziliäre Tätigkeit des murinen Flimmerepithels.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass TNF- $\alpha$  sowohl die PTG als auch die ZSF erhöht. Dieser Effekt zeigte sich bereits kurze Zeit später nach Exposition von TNF- $\alpha$  auf das murine Flimmerepithel. In der Literatur zeigten bereits Jain und Rubinstein 1995 einen Effekt von TNF- $\alpha$  auf die ZSF, der aber erst nach langfristiger Exposition zu beobachten war. TNF- $\alpha$  rief bei ihnen nach vier Stunden eine Erhöhung der ZSF hervor, die dann 24 Stunden persistierte (48). In der vorliegenden Arbeit konnte eine Erhöhung der ZSF und PTG bereits innerhalb 60 Minuten nach Exposition beobachtet werden.

Die Auswirkungen von TNF- $\alpha$  auf die ZSF und die PTG wurden in dieser Arbeit am Organ untersucht. Bis dato wurde die Wirkung von TNF- $\alpha$  nur an kultivierten Zellen untersucht (18, 32, 48). Jain und Rubinstein zum Beispiel entnahmen Bronchi aus frischen Rinderlungen und inkubierten sie über Nacht. Die gewonnenen zilienreichen Aggregate wurden auf einer Petrischale im Medium platziert. Mit einem Phasenkontrastmikroskop konnten sie die ziliäre Bewegung auf Video aufnehmen und auswerten. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde jedoch der

Zilienschlag an murinen Tracheen im Organbad und nicht an kultivierten Zellen des Rindes untersucht. Der Erkenntnisgewinn dieser Arbeit gegenüber Versuchen an kultivierten Zellen war ein anderer, da er den in vivo herrschenden Bedingungen näher kommt als isolierte Zellen. Durch die Untersuchung der PTG konnte der Effekt von TNF- $\alpha$  nicht nur auf zellulärer Ebene untersucht werden, sondern auch auf Ebene des gerichteten Transports über einen großen Abschnitt der Trachea. Somit wurde der koordinierte Transport vieler Zellen betrachtet, wie in vivo (91). Im Gegensatz zu den isolierten Zellenständen in diesem Versuchsaufbau diese im direkten Kontakt und bildeten einen festen Zellverband wie in vivo. Auch Immunzellen und Nervenzellen blieben bei diesem Versuchsaufbau erhalten, die bei einer Kultivierung zilienträger Zellen entfernt würden. Diese Zellen sind auch in vivo in der Trachea präsent und können dort zur Beeinflussung des mukoziliären Transportes beitragen. Die murine Trachea erhielt in dieser Arbeit verwendeten Versuchsaufbau ideale Bedingungen durch ein entsprechendes Nährmedium, die konstante Temperatur und die kurze Präparationszeit des Organs. Dies war ein weiterer Vorteil gegenüber der Zellisolation, die ein größeres Trauma der zilienträger Zellen darstellte. Bei der Methode zur Messung des PTG konnte außerdem beobachtet werden, ob die eingesetzten Partikel (Dynabeads) zielgerichtet transportiert werden. Die kultivierten Zellen konnten zwar eine Erhöhung oder Erniedrigung der ZSF zeigen, aber dadurch kann kein Rückschluss auf den effektiven Transport gezogen und somit ein wichtiger Aspekt der mukoziliären Clearance nicht beurteilt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde mit dem gewählten Versuchsaufbau die PTG gemessen und gleichzeitig konnte ich so visuell kontrollieren, ob die Partikel effektiv transportiert werden. Ein weiterer Vorteil des Versuchsaufbaus gegenüber kultivierten Zellen war, dass nach Messung der PTG in weiteren Versuchsreihen und unter gleichen Voraussetzungen auf zellulärer Ebene der mukoziliären Clearance anhand der ZSF beurteilt werden konnte. Das hieß die ZSF wurde nach gleicher Präparation des Organs, im gleichen Nährmedium und unter konstanter Temperatur wie die PTG gemessen. Das machte die beiden Methoden untereinander vergleichbar, mit dem Ergebnis, dass die Erhöhung der ZSF stark mit der Erhöhung der PTG korrelierte (s. Abbildung 13). Dies bedeutet, dass, dass TNF- $\alpha$  die Zilenschlagfrequenz erhöht und die Partikeltransportgeschwindigkeit direkt davon abhängig ist. Es hätte auch sein können, dass evtl. nur die Zilienschlagstärke erhöht wird, ohne Veränderung der ZSF, dieser Mechanismus aber trotzdem in einer gesteigerten Partikeltransport-

geschwindigkeit resultiert. Auch bei der Messung der ZSF bestand weiterhin der Zellverband und die Funktion der zilientragenden Zellen wurde nicht durch den Prozess der Isolierung und Kultivierung beeinträchtigt.

Durch das Organbad wurde die Zilien bedeckende Mukusschicht außerdem gewaschen. Dadurch konnte die ziliäre Komponente des Partikeltransportes ohne Einfluss der Mukusschicht betrachtet werden. In anderen Systemen wurde der mukoziliäre Transport unter Einfluss der Mukusschicht gemessen. So konnte nicht ausgeschlossen werden, ob die Mukusschicht den ziliären Schlag beeinflusst (22, 30, 116). In früheren Arbeiten wurde angenommen, dass nur ein effektiver Partikeltransport und Zilienschlag in intakter Mukusschicht möglich sei (27, 121). Die Zilien des Trachealepithels umgeben zwei Schichten: die periziliäre Flüssigkeitsschicht und die Mukusschicht. Die Zilien greifen mit der ziliären Krone der Zilienspitze in den Mukus und transportieren diesen und die darauf liegenden Partikel koordiniert zum Larynx. Ohne den Mukus würde der Partikeltransport reduziert und die periziliäre Flüssigkeit nicht weiter transportiert (100). In den letzten Jahren jedoch konnte sich diese Hypothese nicht bestätigen. Der Mechanismus der mukoziliären Clearance ist nämlich bis dato noch nicht ganz verstanden und wird weiterhin untersucht. In der Arbeit von Hussong et al. 2013 konnte im Gegensatz zur bis dahin bekannter Literatur gezeigt werden, dass der Mukus nicht notwendig war, um einen effektiven Transport von periziliärer Flüssigkeit und Partikeln zu erreichen (44). Diese Studie benutzte unter anderem das Setup zur Messung der PTG und ZSF, das bereits von Klein et al. 2009 verwendet wurde, um den Einfluss einzelner muskarinischer Rezeptorsubtypen auf die PTG zu untersuchen (53), sowie von König et al. 2009, um den Einfluss von Serotonin auf die PTG in der murinen Trachea zu untersuchen (56). Die isolierte Trachea wurde in diesen Studien in HEPES-Ringer Lösung inkubiert. Dies hatte zur Folge, dass einmal der bestehende Mukus der Trachea und zum anderen nachproduzierter Mukus gewaschen wurde. Der Partikeltransport und der Zilienschlag konnten so unabhängig vom Einfluss der Mukusschicht untersucht werden. Es zeigte sich auch, dass der Partikeltransport nicht durch das Fehlen der Mukusschicht beeinträchtigt war. In der Arbeit von Hussong et al. 2013 wurde die Methode von König et al. und Klein et al. mit einer Strömungsmesstechnik kombiniert. Diese Methode nennt sich „*Particle Image Velocimetry*“ und wurde bereits zur Visualisierung von Blutströmungen in biologischen Systemen eingesetzt. Mit diesen Methoden konnte

die Arbeit zeigen, dass ohne die Mukusschicht auch die periziliäre Flüssigkeit direkt von den Zilien transportiert wurde.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde das gleiche Messsystem eingesetzt, das in den Arbeiten von König et al. (2009), Klein et al. (2009) und Hussong et al. (2013) zur Untersuchung der mukoziliären Clearance verwendet wurde. Es war dadurch bereits eine etablierte Methode, die als Grundlage für sichere und zuverlässige Messergebnisse der PTG und ZSF dienen konnte.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von TNF- $\alpha$  in unterschiedlichen Konzentrationen auf den mukoziliären Transport untersucht. Zur Ermittlung der idealen Konzentrationen von TNF- $\alpha$  für diesen Versuchsaufbau dienten verschiedene Arbeiten als Grundlage: Bei Patienten mit *acute respiratory distress syndrom* (ARDS) wurde im Bronchialsekret nach bronchoalveolärer Lavage Konzentrationen von TNF- $\alpha$  über 10 ng/ml gemessen. Eine bronchoalveoläre Lavage ist eine Methode zur Probengewinnung von Bronchialsekret durch die Spülung der unteren Atemwege mit isotoner Flüssigkeit mittels einer Bronchoskopie (Lungenspiegelung) am Patienten. Die gemessene Konzentration war als verdünnt anzusehen, weil durch die eingesetzte isotonische Flüssigkeit zur Probengewinnung das Bronchialsekret an sich verdünnt wurde. Des Weiteren war auf zellulärer Ebene zu bedenken, dass alveoläre Makrophagen lokal an den Zilien tragenden Zellen viel höhere Konzentrationen von TNF- $\alpha$  (bis zu 2400 ng/ml) ausschütten. Aus diesem Grund wurde bereits in der wissenschaftlichen Arbeit von Schulman et al. am Lungenperfusionsmodell der Ratte Konzentrationen von 10, 100 sowie 1000 ng/ml verwendet, um realistische Bedingungen zu schaffen (93, 106). Die in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen reichten daher von 100 bis 1000 ng/ml TNF- $\alpha$ . Zum Ausschluss einer toxischen Wirkung der verwendeten Konzentrationen, wurde zum Ende eines jeden Experiments eine interne Vitalitätsprobe mittels ATP durchgeführt. Die internen Vitalitätsproben wurden am Ende jedes Experimentes bestanden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass der Effekt von TNF- $\alpha$  tatsächlich dosisabhängig ist (s. Abbildung 11). Unter konstanter Applikation von TNF- $\alpha$  wurde eine Erhöhung der PTG und ZSF innerhalb von 60 Minuten beobachtet. Ein heterogener zeit- und dosisabhängiger Effekt von TNF- $\alpha$  wurde bereits in anderen Zellen beschrieben. In Zellen des Rhabdomyosarkoms KYM-1 konnte TNF- $\alpha$  dosisabhängig über Aktivierung der Caspasen die Apoptose induzieren. Parallel dazu wurde auch die NF- $\kappa$ B Signalkaskade getriggert (92). Ferner wurden

dosisabhängige Effekte von TNF- $\alpha$  auch auf Immunzellen beobachtet. Hohe Dosen provozierten eine maximale Adhäsion von murinen T-Zellen an murinen arteriellen Endothelzellen, menschlichen Endothelzellen der Nabelschnur und bovinen Endothelzellen der Aorta (3).

Naturgemäß lag die Vermutung nahe, dass TNF- $\alpha$  als proinflammatorischer Mediator direkt die Flimmerepithelzellen stimulierte. Die Rezeptoren TNF-R1 und TNF-R2 sind die hauptsächlichen Bindungspartner für TNF- $\alpha$ . In der vorliegenden Arbeit wurde mittels quantitativer PCR die Expression von TNF-R1 und TNF-R2 im trachealen Gewebe untersucht. Es wurde beobachtet, dass TNF-R1 stärker exprimiert wurde als TNF-R2. Dies ließ vermuten, dass TNF- $\alpha$  über seinen Hauptrezeptor TNF-R1 den Zilienschlag des Flimmerepithels erhöhen und so die mukoziliäre Clearance im Entzündungsprozess der Atemwege beeinflussen kann. Ermert et al. hatten 2003 an Ratten und menschlichem Lungengewebe die Expression von TNF-R1, TNF-R2, TNF- $\alpha/\beta$  und TACE untersucht (28). TNF-R1 wurde dabei hauptsächlich in bronchialen Epithelzellen, alveolären Makrophagen und den glatten Muskelzellen der Gefäße nachgewiesen. TNF-R2 konnte nur auf alveolären Makrophagen nachgewiesen werden. Jedoch wurde TNF-R2 in unterschiedlichen Intensitäten auch in anderen Zellpopulationen exprimiert (28). In den Versuchen mit TNF-R1<sup>-/-</sup> Mäusen war der stimulierende Effekt von TNF- $\alpha$  auf die ZSF nicht mehr nachweisbar. Auch die dosisabhängige Erhöhung der ZSF konnte in den TNF-R1<sup>-/-</sup> Mäusen nicht mehr hervorgerufen werden. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Erhöhung der ZSF von dem Rezeptor TNF-R1 abhängig ist. Es wurden auch Versuche durchgeführt, um den Effekt von TNF- $\alpha$  unter Inhibition des TNF-R1 mittels Antikörper zu untersuchen. Jedoch zeigten die Versuche widersprüchliche Ergebnisse, wobei die PTG unter Inhibition des TNF-R1 anstieg, jedoch nicht in der Kontrolle unter Applikation mit dem unspezifischen Immunglobulin. Obwohl die Versuche der PTG mit abgesättigten Dynabeads durchgeführt wurden, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass der Antikörper nicht doch an die Dynabeads gebunden wurde und somit nicht den Rezeptor inhibieren konnte. Die ausgeprägte Heterogenität im Verlauf der aufgezeichneten Kurven der einzelnen Versuche ließ dies vermuten.

In den Versuchen mit den TNF-R1<sup>-/-</sup> Mäusen konnte durch die Bestimmung der ZSF explizit die ziliäre Komponente des TNF- $\alpha$  abhängigen Effekts in Zusammenhang mit TNF-R1 untersucht werden. Nicht nur im Flimmerepithel konnte eine Beteiligung des TNF-R1 an der Signaltransduktion gezeigt werden. In

wissenschaftlichen Arbeiten wurde TNF-R1 auch in den unteren Atemwegen an glatten Muskelzellen nachgewiesen. Dort wurde sowohl TNF-R1 und R2 nachgewiesen. Untersuchungen zeigten, dass dort TNF-R1 die Schlüsselrolle zur Aktivierung des NF- $\kappa$ B Signalweges und Verstärkung des Calciumsignals spielt. Dies trägt zur Überreaktion der Bronchialmuskulatur im entzündlichen Prozess bei (1, 2, 68). Diese Beobachtungen unterstützen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass TNF- $\alpha$  über TNF-R1 die ziliäre Tätigkeit aktiviert und TNF-R2 nur wenig exprimiert ist und in diesem Mechanismus keine Rolle spielt.

## **4.2 Die Beteiligung anderer Signalwege an der Regulation der ziliären Tätigkeit in der Trachea der adulten Maus**

Die ziliäre Tätigkeit wird kontinuierlich von physiologischen Neuromediatoren beeinflusst, die von autonomen Nervenfasern oder von benachbarten Zellen parakrin ausgeschüttet werden (121). Alternative Modulatoren aus anderen Quellen könnten auch zur Regulation der ziliären Tätigkeit beitragen. Stimulation von murinen Trachealepithelzellen, zum Beispiel mit Serotonin, triggert die Ausschüttung von Acetylcholin aus epithelialen Zellen. Das führt zu einer Kontraktion der darunterliegenden glatten Muskulatur (53). Es wurde ebenso beobachtet, dass Acetylcholin die ZSF aktiviert, aber Serotonin die ZSF unabhängig von Acetylcholin beeinflusst, obwohl es Epithelzellen triggert, Acetylcholin auszuschütten. Da diese beiden Botenstoffe unabhängig die ziliäre Tätigkeit aktivieren, wurde in der Arbeit von König et al. der Effekt von Acetylcholin und Serotonin auf die PTG getrennt voneinander untersucht (56, 72).

In der Literatur wurde bereits mehrmals beschrieben, dass die NOS eine große Rolle in der Regulation des Zilienschlages spielt (48, 50). Jain und Rubinstein untersuchten 1995 den Einfluss von TNF- $\alpha$  auf den Zilienschlag. Sie fanden heraus, dass nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  die ZSF anstieg und dieser Anstieg sich durch Zugabe von NOS-Inhibitoren wieder reduzieren ließ. In der vorliegenden Arbeit konnten diese Ergebnisse nicht bestätigt werden. Eine Ursache könnte sein, dass es sich wie oben bereits beschrieben um inkubierte Flimmerepithelzellen vom Rind handelte. Jain und Rubinstein verwendeten ebenfalls L-NAME und L-NMMA, um die NOS zu inhibieren. Der Partikeltransport zeigte mit L-NAME in den vorliegenden Ergebnissen keine kongruente Reaktion. Die Kurvenverläufe der

einzelnen Versuche waren in allen Gruppen sehr unterschiedlich. Die Versuchsreihe mit L-NMMA zeigte jedoch kongruente Ergebnisse. L-NMMA konnte den TNF- $\alpha$  induzierten Anstieg der PTG nicht unterdrücken. Trotz der inkongruenten Reaktion der PTG auf L-NAME, konnte auch dieser Inhibitor den Anstieg nicht unterdrücken. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass ein anderer Signalweg die Erhöhung der PTG und ZSF nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  auslöste.

Wanner et al. sagten zwar, dass das autonome Nervensystem keine große Rolle in der mukoziliären Clearance spiele (zum Beispiel gab es keine nennenswerte Änderung der Clearance nach Vagotomie bei Hunden (121)). Jedoch gibt es Veröffentlichungen, die einen Effekt auf die Funktion von Zilien durch Atropin, ein Inhibitor der muskarinergen Rezeptoren, beobachtet hatten. Im Gegensatz dazu waren die Effekte von Agonisten des muskarinergen Rezeptors eindeutig: Acetylcholin und Muskarin erhöhen sowohl die PTG als auch die ZSF (56, 87). Um auszuschließen, dass die Erhöhung der PTG aus einer parakrinen Stimulation der muskarinergen Rezeptoren resultierte, wurde Atropin ein unspezifischer Inhibitor muskarinergere Rezeptoren eingesetzt. Atropin konnte den Effekt von TNF- $\alpha$  nicht unterdrücken. Demnach konnte angenommen werden, dass die beobachtete Erhöhung der PTG wahrscheinlich nicht über den muskarinergen Rezeptor vermittelt wurde. König et al. beobachteten dass Atropin zwar die Erhöhung der PTG von Muskarin wie oben erwähnt unterdrücken konnte, aber die von Serotonin jedoch nicht (56). Diese Ergebnisse legten die Vermutung nahe, dass die Erhöhung der PTG und ZSF nach der Stimulation mit TNF- $\alpha$  durch den 5-HT-Rezeptor vermittelt sein könnten. König et al. arbeiteten mit dem gleichen Versuchsaufbau wie in dieser Arbeit. Serotonin ist ein Derivat von Tryptophan und bekannt als Neurotransmitter. Es reguliert verschiedene biologische Prozesse auch außerhalb des zentralen Nervensystems und hat einen direkten Einfluss auf das kardiovaskuläre System, zum Beispiel in der Regulation der Herzfrequenz. Besonders im gastrointestinalen Trakt spielt Serotonin eine wichtige Rolle. Es stimuliert die Peristaltik und die intestinale Sekretion. In der Lunge ist Serotonin an der Pathogenese der pulmonalen Hypertonie beteiligt. Unter der Hypoxie steigt die intravaskuläre Konzentration von Serotonin an. Das stimuliert die Serotonin-Rezeptoren des Endothels der pulmonalen Arterien, worauf deren Widerstand erhöht wird. Zusätzlich induziert Serotonin das Remodelling der pulmonalen Arterien durch eine Hypertrophie der glatten Muskelzellen (7, 29, 51). Die Wirkung von Serotonin auf die ziliäre Aktivität wurde in den neunziger Jahren an verschiedenen

Spezies bereits untersucht. Zum Beispiel zeigten Christopher et al., dass Serotonin (5-HT) die ZSF in der Schneckenart *Helisoma trivolis*, erhöhte (20). Dies griffen König et al. 2009 auf und untersuchten, ob Serotonin einen Effekt auf die PTG der murinen Trachea hatte. Serotonin erhöhte danach sowohl die PTG als auch die ZSF. Die Autoren der Studie konnten zeigen, dass Methysergide, ein Serotonin-Rezeptor (5-HT)-Antagonist, diesen Anstieg unterdrückt. Im chronischen Asthma Maus Modell reduzierte bereits Methysergide nach intranasaler Applikation die Entzündungsreaktion und das Remodelling der Atemwege (65). In Ratten konnte Methysergide die frühe Allergen-vermittelte Immunreaktion abmildern (74).

In der vorliegenden Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass die TNF- $\alpha$  einen beschleunigenden Effekt auf die PTG und ZSF der murinen Trachea hat. Aufgrund der Ergebnisse von König et al. und der Versuchsreihe mit TNF-R1<sup>-/-</sup> Mäusen wurden in einer Versuchsreihe die 5-HT-Rezeptoren mit Methysergide blockiert. Die Konzentration von Methysergide wurde auf Grundlage der Versuche von König et al. gewählt. Methysergide konnte den Effekt von TNF- $\alpha$  auf die PTG unterdrücken. Methysergide ist jedoch ein unspezifischer Rezeptorantagonist. Die Serotoninrezeptorfamilie umfasst mindestens vierzehn verschiedene Rezeptoren, die von 5-HT<sub>1</sub> bis 5-HT<sub>7</sub> eingeteilt werden (43). In weiteren Versuchen wurde deswegen weiter am gleichen Setup der vorliegenden Arbeit untersucht, welcher Rezeptor der Serotoninrezeptorfamilie den Anstieg der PTG vermittelt. Es wurde Cyproheptadine, ein selektiver 5-HT<sub>2</sub> Antagonist, und WAY-100635, ein selektiver 5HT<sub>1A</sub> Antagonist, eingesetzt. Der Anstieg der PTG lediglich durch Cyproheptadine unterdrückt werden. Diese pharmakologischen Ergebnisse lassen vermuten, dass über die Aktivierung des 5-HT<sub>2</sub> Rezeptors die PTG stimuliert wird (124). Dies deutete darauf hin, dass TNF- $\alpha$  eine Ausschüttung von Serotonin induziert, die eine Erhöhung der PTG durch Aktivierung des 5-HT<sub>2</sub> zu Folge hat (107).

Es ist bisher aber noch unklar aus welcher Quelle das Serotonin stammt. Eine mögliche Quelle von Serotonin sind Thrombozyten (4), die während einer akuten Entzündungsreaktion aufgrund der „capillary leakage“ aus dem Kreislaufsystem in das Epithel übertreten könnten. Dies wäre eine Möglichkeit, wie Serotonin die mukoziliären Clearance beeinflussen könnte, um pathogene Substanzen besonders in der akuten Inflammation aus den Luftwegen zu entfernen. In diesem Versuchsaufbau war es sehr unwahrscheinlich, dass Thrombozyten die Quelle von Serotonin sind, da nach Entnahme die Trachea blutleer war. Eine andere Quelle sind



im Flimmerepithel bestehende neuroepitheliale Körper. Dies sind Gruppen von neuroendokrinen Zellen, die verteilt im Flimmerepithel der unteren Atemwege von Säugetieren (auch in Mäusen vorkommen) (77). Sie enthalten Serotonin und können dies parakrin ausschütten. Die genaue Rolle dieser Zellcluster ist noch nicht ganz verstanden. Einige Arbeiten vermuten, dass es Chemorezeptoren der Atemwege sind. Sie konnten zeigen, dass Hypoxie diese Zellen stimuliert, Serotonin auszuschütten. Dieser Effekt wurde in Gewebeschnitten und in Zellkultur beobachtet (23, 33). In dem Versuchsaufbau dieser Arbeit war das ganze Organ erhalten und mit ausreichend Sauerstoff versorgt. Außerdem kommen neuroepitheliale Körper nur in kleiner Anzahl und diffus über das Atemwegsepithel verteilt vor. Das macht einen durch die neuroepithelialen Körper ausgelösten Anstieg der PTG über weite Abschnitte der Trachea wie in diesem Versuchsaufbau unwahrscheinlich, da keine Hypoxie vorlag. Eine naheliegende Quelle von Serotonin in diesem Versuchsaufbau sind Mastzellen. König et al. hatten mittels Immunfluoreszenz Mastzellen im Trachealepithel von Mäusen bereits identifiziert, die Serotonin synthetisierten (56). Es war weiterhin bekannt, dass Mastzellen Serotonin in murinen Tracheen ausschütten und damit den 5-HT<sub>2</sub> Rezeptor an parasymphatischen Neuronen aktiviert. Diese schütten daraufhin wiederum Acetylcholin aus, das eine Kontraktion der glatten Muskulatur der Atemwege auslöst (123).

Normalerweise werden Mastzellen über einen antigen-induzierten „Cross-Linking“ der membranständigen IgE-Rezeptoren aktiviert, Serotonin auszuschütten. Für zukünftige Versuche gilt es zu klären, ob Mastzellen TNF-Rezeptoren auf ihrer Zellmembran exprimieren und TNF- $\alpha$  diese direkt stimuliert Serotonin auszuschütten. Bei Untersuchungen an Ratten konnte gezeigt werden, dass zum einen Mastzellen unter inflammatorischen Bedingungen TNF- $\alpha$  ausschütteten und zum anderen TNF- $\alpha$  über TNF-R1 Mastzellen chemotaktisch stimuliert (13). In vivo könnte es auch sein, dass TNF- $\alpha$  nicht die Mastzellen direkt aktiviert, sondern das Flimmerepithel stimuliert, Mastzellen im akuten Entzündungsprozess anzulocken, die dann degranulieren und unter anderem die ziliäre Tätigkeit erhöhen. Dies führt dann zu einer Reinigung des Trachealepithels von schädlichen Substanzen. In der Literatur wurde bereits die Interaktion von Mastzellen und Epithelzellen untersucht. Kneilling et al. zeigten, dass die lokale Inflammation zwischen Mastzellen und TNF-R1 Rezeptor tragende Epithelzellen am Ohr von Mäusen vermittelt wurde (54).

Der um eine Stunde verzögerte Anstieg der PTG und ZSF nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  könnte ein weiterer Hinweis darauf sein, dass es sich um einen extrazellulären Signalweg mit chemotaktischer Komponente handelt. An anderen Krankheitsbildern wie der Zystitis wurde bereits untersucht, dass Mastzellen sich TNF- $\alpha$  abhängig in der Lamina propria des Blasenepithels akkumulieren und eine Dysfunktion der Barriere hervorrufen (19).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass der TNF- $\alpha$  induzierte Anstieg der PTG und der ZSF komplett von Methysergide unterdrückt werden konnte. Deshalb kann angenommen werden, dass der in dieser Arbeit beobachtete TNF- $\alpha$  induzierte frühe Anstieg durch die Ausschüttung von Serotonin und die daraus resultierende Stimulation der ziliären Tätigkeit unabhängig von dem späten Anstieg der ZSF in isolierten und kultivierten bovinen zilientragenden Zellen ist. Weiterhin gab es keine Interaktion zwischen der Inhibition von NO oder Acetylcholin und der beobachteten Stimulation der PTG durch TNF- $\alpha$ . Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit ist zusammenfassend anzunehmen, dass TNF- $\alpha$  die PTG und ZSF stimuliert, indem es an die TNF-R1 Rezeptoren auf trachealen Mastzellen oder in geringem Umfang an neuroepitheliale Körper bindet, welche daraufhin Serotonin ausschütten. Diese Kaskade könnte als Schutzfunktion während der frühen Phase des Entzündungsprozesses in den Atemwegen dienen.

### **4.3 Konklusion**

TNF- $\alpha$  erhöht früh die PTG und ZSF in der murinen Trachea im Organbad. Diese Erhöhung der TNF- $\alpha$  ist TNF-R1 vermittelt. Für diese Erhöhung spielt Serotonin eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion. Da im Flimmerepithel Mastzellen die hauptsächliche Quelle von Serotonin sind, können diese über die Aktivierung der TNF-R1 Rezeptoren degranulieren und die PTG mittels Serotonin erhöhen. Somit ist es möglich, dass TNF- $\alpha$  nicht nur direkt das Flimmerepithel stimuliert, sondern auch über Mastzellendegranulation sekundär die ziliäre Tätigkeit beeinflusst. Deswegen ist anzunehmen, dass eine Kommunikation zwischen dem Immunsystem und den zilientragenden Zellen des Flimmerepithels besteht. Es ist auszuschließen, dass die frühe Stimulation der PTG und ZSF durch TNF- $\alpha$  über NO oder Acetylcholin vermittelt ist.

.

## 5 Zusammenfassung

Die mukoziliäre Clearance gehört zu den angeborenen Verteidigungsmechanismen der Atemwege. Sie schützt vor dem Eindringen von Pathogenen in den Organismus. Die ziliäre Tätigkeit des respiratorischen Epithels spielt die zentrale Schlüsselrolle in der Aufrechterhaltung der mukoziliären Clearance. Bakterien nutzen die Zilien als Angriffsziel, um in den Organismus einzudringen. Sie heften sich an die Flimmerepithelzellen an und behindern ein koordiniertes Schlagen der Zilien. Dies löst wiederum eine lokale Entzündungsreaktion des Gewebes aus. TNF- $\alpha$  ist der Hauptspieler in der Vermittlung der lokalen Entzündungsreaktion. Als eines der wichtigsten proinflammatorischen Zytokine übt es im Körper verschiedene Funktionen aus. Die vorliegende Arbeit untersuchte, ob TNF- $\alpha$  einen Einfluss auf den ziliären Transport in der Trachea der Maus ausübt. Mittels Messung der Partikeltransportgeschwindigkeit und der Zilienschlagfrequenz der murinen Trachea im wässrigen Medium konnte gezeigt werden, dass TNF- $\alpha$  mit einer Latenzzeit von circa vierzig bis sechzig Minuten eine Erhöhung sowohl der PTG als auch ZSF auslöst. Weiterhin zeigte die quantitative PCR, dass TNF-R1 und R2 in der Trachea exprimiert wird. Messungen der ZSF an TNF-R1<sup>-/-</sup> Mäusen zeigten, dass nach Ausschaltung des TNF-R1 diese Erhöhung nicht mehr nachweisbar ist. Um weitere mögliche Signalwege der TNF- $\alpha$  induzierten Erhöhung der PTG zu untersuchen, wurden Versuche mit NOS-Inhibitoren (L-NAME und L-NMMA), einem muskarinergen Rezeptor-Antagonist (Atropin) und einem 5-HT-Rezeptor-Antagonist (Methysergide) durchgeführt. Durch die Inhibition der NOS oder des muskarinergen Rezeptors wurde die beschleunigte PTG durch TNF- $\alpha$  nicht verhindert. TNF- $\alpha$  scheint über einen noch nicht bekannten Signalweg Serotoninvermittelt den ziliären Transport zu aktivieren. Mastzellen und TNF- $\alpha$  beeinflussen die Funktion von Epithel im Entzündungsprozess. Mastzellen sind Träger von Serotonin in intrazellulären Granula. Aufgrund der Ergebnissen dieser Arbeit ist es sehr wahrscheinlich, dass TNF- $\alpha$  tracheale Mastzellen über TNF-R1 stimuliert und diese anschließend Serotonin freisetzen. In Folge davon wird die ziliäre Tätigkeit der murinen Trachea zu erhöht.

## 6 Summary

The mucociliary clearance is part of the innate defense mechanism of the airways. It protects the organism against the invasion of pathogens. The ciliary action of the airway epithelium plays a key role in the maintenance of the mucociliary clearance. Bacteria stick to the cilia and constrict their coordinated beating. This causes a local inflammation of the tissue. TNF- $\alpha$  is a major player in the mediation of local inflammation and it acts as one of the main proinflammatory cytokine, which alters several functions in the body. This study examined if TNF- $\alpha$  influenced the ciliary transport in the murine trachea. By measuring the particle transport velocity (PTV) and ciliary beat frequency (CBF) in the murine trachea in liquid media I showed that TNF- $\alpha$  increases PTV and CBF with a latency of about forty up to sixty minutes. Furthermore quantitative PCR provided evidence that TNF-R1 and R2 are expressed in the murine trachea. Measurements in TNF-R1<sup>-/-</sup> mice revealed that the activation of CBF was almost completely suppressed. To examine further signaling pathways I applied in further experiments two different NOS-inhibitors, L-NAME or L-NMMA, or the muscarinic receptor antagonist Atropine or the 5HT receptor antagonist Methysergide. These experiments clearly demonstrated that the TNF- $\alpha$  mediated increase of the PTV or CBF was neither suppressed by the inhibition of NOS nor by the muscarinic receptor. However, TNF- $\alpha$  influences the ciliary transport in the murine trachea via a serotonin mediated pathway but with still unknown receptor subtype. Mast cells and TNF- $\alpha$  influence the epithelial function in acute inflammation. Mast cells are carrier of serotonin in granula. It is likely on the present results that TNF- $\alpha$  stimulates TNF-R1 receptors of tracheal mast cells which then release serotonin and causes the increase of ciliary activity.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

|            |   |
|------------|---|
| β-MG       | Beta-Mikroglobulin                                    |
| Δ          | Delta   |
| °C         | Grad Celsius  |
| μl         | Mikroliter  |
| μm         | Mikrometer  |
| μM         | Mikromol  |
| 5-HT       | Serotonin   |
| 5-HT-2B    | Methysergide  |
| Abb.       | Abbildung   |
| Aqua dest. | Aqua destillata                                       |
| as         | antisense   |
| ATP        | Adenosintriphosphat                                   |
| ATPase     | Adenosintriphosphatase                                |
| bp         | Basenpaare  |
| bzw        | beziehungsweise                                       |
| cAMP       | zyklisches Adenosinmonophosphat                       |
| CBF        | ciliary beat frequenz                                 |
| cDNA       | komplementäre Desoxyribonukleotidsäure                |
| cGMP       | zyklisches Guanosinmonophosphat                       |
| cm         | Zentimeter  |
| CT         | Zyklus  |
| d          | Distanz   |
| dATP       | Desoxyadenosintriphosphat                             |
| dCTP       | Desoxycytosintriphosphat                              |
| dGTP       | Desoxyguanosintriphosphat                             |
| DNA        | Desoxyribonukleotidsäure                              |
| Dnase      | Desoxyribonuklease                                    |
| DTT        | Dithiothreitol  |
| dTTP       | Desoxythyosintriphosphat                              |
| EDTA       | Ethylendiamintetraacetat                              |
| g          | Gramm   |
| g          | Erdbeschleunigung                                     |
| Hz         | Hertz   |
| IL-1       | Interleukin-1   |
| IL-8       | Interleukin-8   |
| iNOS       | induzierbare NO-Synthase                              |
| kDa        | kiloDalton  |
| L-NAME     | N $\omega$ -Nitro-L-Arginin-Methyl-Ester-Hydrochlorid |
| L-NMMA     | L-N <sup>G</sup> -Monomethyl-Arginin-Citrat           |
| M          | Molar   |
| M.         | Musculus  |
| MD         | Meridian  |
| min        | Minuten   |
| ml         | Milliliter  |
| mM         | Millimolar  |
| mRNA       | messenger Ribonukleinsäure                            |
| MW         | Mittelwert  |
| n          | Anzahl  |

|               |  |
|---------------|--|
| NaOH          | Natriumhydroxid                        |
| ng            | Nanogramm                              |
| NO            | Stickstoffmonoxid                      |
| NOS           | Stickstoffmonoxidsynthase              |
| PAF           | Platelet Activating Factor             |
| PCR           | Polymeraskettenreaktion                |
| PMN           | polymorphkernigeneutrophile Leukozyten |
| PTG           | Partikeltransportgeschwindigkeit       |
| PTV           | particletransportvelocity              |
| qPCR          | quantitative Polymeraskettenreaktion   |
| RNA           | Ribonukleinsäure                       |
| RT            | Reverse Transkriptase                  |
| s             | Sekunde                                |
| S             | sense                                  |
| s.            | siehe                                  |
| SEM           | Standardfehler                         |
| t             | Zeit                                   |
| TACE          | TNF- $\alpha$ convertingenzyme         |
| TNF-R1        | Tumornekrosefaktor Rezeptor 1          |
| TNF-R2        | Tumornekrosefaktor Rezeptor 2          |
| TNF- $\alpha$ | Tumornekrosefaktoralpha                |
| v             | Geschwindigkeit                        |
| V             | Volt                                   |
| ZSF           | Zilienschlagfrequenz                   |

## 8 Abbildungsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| Abbildung 1: Aufbau des Flimmerepithels in den Atemwegen.....  | 1  |
| Abbildung 2: Schematische Zeichnung der sogenannten Radspeichenstruktur einer Zilie im Querschnitt.....                | 2  |
| Abbildung 3: Ablauf der Zilienschlagbewegung .....   | 4  |
| Abbildung 4: Schematische Zeichnung der Wirkung von TNF- $\alpha$ auf verschiedene Zellen .....                        | 12 |
| Abbildung 5: Aufnahme vom eröffneten Mausthorax.....   | 16 |
| Abbildung 6: Trachea im Delta T Kulturschälchen .....  | 17 |
| Abbildung 7: Aufbau des Messstandes.....   | 19 |
| Abbildung 8: Versuchsprotokoll für TNF- $\alpha$ und Inhibitoren .....   | 22 |
| Abbildung 9: Die Basalrate der PTG unter Kontrollbedingungen.....  | 31 |
| Abbildung 10: TNF- $\alpha$ steigert die PTG der murinen Trachea.....  | 31 |
| Abbildung 11: Dosisabhängige Erhöhung der PTG durch TNF- $\alpha$ .....  | 32 |
| Abbildung 12: TNF- $\alpha$ steigert die ZSF im Vergleich zur Kontrolle.....   | 33 |
| Abbildung 13: Korrelation zwischen ZSF und PTG für 360 ng/ml TNF- $\alpha$ .....                                       | 34 |
| Abbildung 14: Gelelektrophorese der PCR-Produkte von TNF-R .....   | 35 |
| Abbildung 15: Stärkere Expression von TNF-R1 als TNF-R2.....   | 36 |
| Abbildung 16: Gelelektrophorese der qPCR-Produkte von TNF-R1 und TNF-R2.....   | 36 |
| Abbildung 17: Der Antikörper anti-Maus CD 120 a unterdrückt nicht die TNF- $\alpha$ induzierte Steigerung der PTG..... | 38 |
| Abbildung 18: Der Einfluss von IgG und TNF- $\alpha$ auf die PTG.....  | 38 |
| Abbildung 19: TNF- $\alpha$ induziert nicht den Anstieg der ZSF bei TNF-R1 <sup>-/-</sup> Mäusen .....                 | 40 |
| Abbildung 20: TNF- $\alpha$ erhöht die PTG über den TNF-R1 .....   | 41 |
| Abbildung 21: L-NMMA beeinflusst nicht den TNF- $\alpha$ induzierten Anstieg der PTG.....                              | 44 |
| Abbildung 22: L-NMMA verändert nicht die basale PTG .....  | 44 |
| Abbildung 23: Atropin verändert nicht die TNF- $\alpha$ induzierte PTG.....  | 45 |
| Abbildung 24: Atropin beeinflusst nicht die PTG.....   | 46 |
| Abbildung 25: Methysergide und TNF- $\alpha$ verändern nicht die PTG .....   | 47 |
| Abbildung 26: Methysergide verändert nicht die Basalrate der PTG .....   | 47 |
| Abbildung 27: Zusammenfassende Darstellung der Experimente mit pharmakologischen Inhibitoren .....                     | 48 |



## 9 Tabellenverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| Tabelle 1: Verwendete Pharmaka in den Versuchen zur Messung der ZSF und PTG .....            | 22 |
| Tabelle 2: Verwendete Reagenzien in Reihenfolge der Zugabe für die Isolierung von mRNA ..... | 25 |
| Tabelle 3: Master-Mix für die PCR .....  | 26 |
| Tabelle 4: Verwendete Primer in der qPCR und PCR.....  | 28 |

## 10 Literaturverzeichnis

1. Amrani Y, Aubier M, Bronner C. [Interaction between tumor necrosis factor- $\alpha$  and the smooth muscle cells of the airway: implication in the physiopathology of asthma]. *Rev Mal Respir* 13: 539-46, 1996.
2. Amrani Y, Lazaar AL, Hoffman R, Amin K, Ousmer S, Panettieri RA, Jr. Activation of p55 tumor necrosis factor- $\alpha$  receptor-1 coupled to tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 stimulates intercellular adhesion molecule-1 expression by modulating a thapsigargin-sensitive pathway in human tracheal smooth muscle cells. *Mol Pharmacol* 58: 237-45, 2000.
3. Aparicio CL, Berthiaume F, Chang CC, Yarmush ML. Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) induces a reversible, time- and dose-dependent adhesion of progenitor T cells to endothelial cells. *Mol Immunol* 33: 671-80, 1996.
4. Askenase PW, Geba GP, Levin J, Ratzlaff RE, Anderson GM, Ushio H, Ptak W, Matsuda H. A role for platelet release of serotonin in the initiation of contact sensitivity. *Int Arch Allergy Immunol* 107: 145-7, 1995.
5. Bailey KL, Levan TD, Yanov DA, Pavlik JA, Devasure JM, Sisson JH, Wyatt TA. Non-typeable *Haemophilus influenzae* decreases cilia beating via protein kinase C epsilon. *Respir Res* 13: 49, 2012.
6. Bartlett JA, Fischer AJ, McCray PB, Jr. Innate immune functions of the airway epithelium. *Contrib Microbiol* 15: 147-63, 2008.
7. Berger M, Gray JA, Roth BL. The expanded biology of serotonin. *Annu Rev Med* 60: 355-66, 2009.
8. Beutler B, Krochin N, Milsark IW, Luedke C, Cerami A. Control of cachectin (tumor necrosis factor) synthesis: mechanisms of endotoxin resistance. *Science* 232: 977-80, 1986.
9. Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, Castner BJ, Stocking KL, Reddy P, Srinivasan S, Nelson N, Boiani N, Schooley KA, Gerhart M, Davis R, Fitzner JN, Johnson RS, Paxton RJ, March CJ, Cerretti DP. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- $\alpha$  from cells. *Nature* 385: 729-33, 1997.
10. Boitano S, Evans WH. Connexin mimetic peptides reversibly inhibit  $\text{Ca}^{2+}$  signaling through gap junctions in airway cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279: L623-L630, 2000.
11. Boucher RC. New concepts of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Eur Respir J* 23: 146-58, 2004.
12. Brandtzaeg P. Immunocompetent cells of the upper airway: functions in normal and diseased mucosa. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 252 Suppl 1: S8-21, 1995.
13. Brzezinska-Blaszczyk E, Pietrzak A, Misiak-Tloczek AH. Tumor necrosis factor (TNF) is a potent rat mast cell chemoattractant. *J Interferon Cytokine Res* 27: 911-9, 2007.

14. Camussi G, Albano E, Tetta C, Bussolino F. The molecular action of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Eur J Biochem* 202: 3-14, 1991.
15. Carson JL, Collier AM, Fernald GW, Hu SC. Microtubular discontinuities as acquired ciliary defects in airway epithelium of patients with chronic respiratory diseases. *Ultrastruct Pathol* 18: 327-32, 1994.
16. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72: 3666-70, 1975.
17. Cassiere HA, Niederman MS. New etiopathogenic concepts of ventilator-associated pneumonia. *Semin Respir Infect* 11: 13-23, 1996.
18. Chen JH, Takeno S, Osada R, Ueda T, Yajin K. Modulation of ciliary activity by tumor necrosis factor- $\alpha$  in cultured sinus epithelial cells. Possible roles of nitric oxide. *Hiroshima J Med Sci* 49: 49-55, 2000.
19. Chen MC, Keshavan P, Gregory GD, Klumpp DJ. RANTES mediates TNF-dependent lamina propria mast cell accumulation and barrier dysfunction in neurogenic cystitis. *Am J Physiol Renal Physiol* 292: F1372-F1379, 2007.
20. Christopher K, Chang J, Goldberg J. Stimulation of cilia beat frequency by serotonin is mediated by a  $Ca^{2+}$  influx in ciliated cells of *Helisoma trivolvis* embryos. *J Exp Biol* 199: 1105-13, 1996.
21. Cole AM, Dewan P, Ganz T. Innate antimicrobial activity of nasal secretions. *Infect Immun* 67: 3267-75, 1999.
22. Connolly TP, Noujaim AA, Man SF. Simultaneous canine tracheal transport of different particles. *Am Rev Respir Dis* 118: 965-8, 1978.
23. Cutz E, Speirs V, Yeger H, Newman C, Wang D, Perrin DG. Cell biology of pulmonary neuroepithelial bodies--validation of an in vitro model. I. Effects of hypoxia and  $Ca^{2+}$  ionophore on serotonin content and exocytosis of dense core vesicles. *Anat Rec* 236: 41-52, 1993.
24. Dempsey PW, Doyle SE, He JQ, Cheng G. The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev* 14: 193-209, 2003.
25. Eck MJ, Sprang SR. The structure of tumor necrosis factor- $\alpha$  at 2.6 Å resolution. Implications for receptor binding. *J Biol Chem* 264: 17595-605, 1989.
26. Efimov GA, Kruglov AA, Tillib SV, Kuprash DV, Nedospasov SA. Tumor Necrosis Factor and the consequences of its ablation in vivo. *Mol Immunol* 47: 19-27, 2009.
27. Eliezer N, Sade J, Silberberg A, Nevo AC. The role of mucus in transport by cilia. *Am Rev Respir Dis* 102: 48-52, 1970.
28. Ermert M, Pantazis C, Duncker HR, Grimminger F, Seeger W, Ermert L. In situ localization of TNF $\alpha$ / $\beta$ , TACE and TNF receptors TNF-R1 and TNF-R2 in control and LPS-treated lung tissue. *Cytokine* 22: 89-100, 2003.
29. Esteve JM, Launay JM, Kellermann O, Maroteaux L. Functions of serotonin in hypoxic pulmonary vascular remodeling. *Cell Biochem Biophys* 47: 33-44, 2007.

30. Foster WM, Walters DM, Longphre M, Macri K, Miller LM. Methodology for the measurement of mucociliary function in the mouse by scintigraphy. *J Appl Physiol* (1985 ) 90: 1111-7, 2001.
31. Francis RJ, Chatterjee B, Loges NT, Zentgraf H, Omran H, Lo CW. Initiation and maturation of cilia-generated flow in newborn and postnatal mouse airway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 296: L1067-L1075, 2009.
32. Freitag A, Reimann A, Wessler I, Racke K. Effects of bacterial lipopolysaccharides (LPS) and tumour necrosis factor-alpha (TNF alpha) on rat tracheal epithelial cells in culture: morphology, proliferation and induction of nitric oxide (NO) synthase. *Pulm Pharmacol* 9: 149-56, 1996.
33. Fu XW, Nurse CA, Wong V, Cutz E. Hypoxia-induced secretion of serotonin from intact pulmonary neuroepithelial bodies in neonatal rabbit. *J Physiol* 539: 503-10, 2002.
34. Gaillard D, Jouet JB, Egreteau L, Plotkowski L, Zahm JM, Benali R, Pierrot D, Puchelle E. Airway epithelial damage and inflammation in children with recurrent bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 150: 810-7, 1994.
35. Gudis DA, Cohen NA. Cilia dysfunction. *Otolaryngol Clin North Am* 43: 461-72, vii, 2010.
36. Gustke H, Kleene R, Loers G, Nehmann N, Jaehne M, Bartels KM, Jaeger KE, Schachner M, Schumacher U. Inhibition of the bacterial lectins of *Pseudomonas aeruginosa* with monosaccharides and peptides. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 31: 207-15, 2012.
37. Hansell MM, Moretti RL. Ultrastructure of the mouse tracheal epithelium. *J Morphol* 128: 159-69, 1969.
38. Hansell MM, Moretti RL. Ultrastructure of the mouse tracheal epithelium. *J Morphol* 128: 159-69, 1969.
39. Hehlhans T, Pfeffer K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* 115: 1-20, 2005.
40. Hingley ST, Hastie AT, Kueppers F, Higgins ML. Disruption of respiratory cilia by proteases including those of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 54: 379-85, 1986.
41. Hingley ST, Hastie AT, Kueppers F, Higgins ML, Weinbaum G. Bacterial ciliostatic factors; effect on respiratory cilia. *Eur J Respir Dis Suppl* 146: 291-3, 1986.
42. Hingley ST, Hastie AT, Kueppers F, Higgins ML, Weinbaum G, Shryock T. Effect of ciliostatic factors from *Pseudomonas aeruginosa* on rabbit respiratory cilia. *Infect Immun* 51: 254-62, 1986.
43. Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, Mylecharane EJ, Saxena PR, Humphrey PP. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol Rev* 46: 157-203, 1994.
44. Hussong J, Lindken R, Faulhammer P, Noreikat K, Sharp KV, Kummer W, Westerweel J. Cilia-driven particle and fluid transport over mucus-free mice tracheae. *J Biomech* 46: 593-8, 2013.

45. Idriss HT, Naismith JH. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc Res Tech* 50: 184-95, 2000.
46. Ishiga T, Tanigawa M, Ichioka M, Saito K. [A case of Kartagener's syndrome]. *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi* 43: 155-9, 2005.
47. Jain B, Rubinstein I, Robbins RA, Leise KL, Sisson JH. Modulation of airway epithelial cell ciliary beat frequency by nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 191: 83-8, 1993.
48. Jain B, Rubinstein I, Robbins RA, Sisson JH. TNF-alpha and IL-1 beta upregulate nitric oxide-dependent ciliary motility in bovine airway epithelium. *Am J Physiol* 268: L911-L917, 1995.
49. Jiao J, Han D, Meng N, Jin S, Zhang L. Regulation of tracheal ciliary beat frequency by nitric oxide synthase substrate L-arginine. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 72: 6-11, 2010.
50. Jiao J, Wang H, Lou W, Jin S, Fan E, Li Y, Han D, Zhang L. Regulation of ciliary beat frequency by the nitric oxide signaling pathway in mouse nasal and tracheal epithelial cells. *Exp Cell Res* 317: 2548-53, 2011.
51. Kereveur A, Callebort J, Humbert M, Herve P, Simonneau G, Launay JM, Drouet L. High plasma serotonin levels in primary pulmonary hypertension. Effect of long-term epoprostenol (prostacyclin) therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 2233-9, 2000.
52. Khan MA. Inflammation signals airway smooth muscle cell proliferation in asthma pathogenesis. *Multidiscip Respir Med* 8: 11, 2013.
53. Klein MK, Haberberger RV, Hartmann P, Faulhammer P, Lips KS, Krain B, Wess J, Kummer W, Konig P. Muscarinic receptor subtypes in cilia-driven transport and airway epithelial development. *Eur Respir J* 33: 1113-21, 2009.
54. Kneilling M, Mailhammer R, Hultner L, Schonberger T, Fuchs K, Schaller M, Bukala D, Massberg S, Sander CA, Braumuller H, Eichner M, Maier KL, Hallmann R, Pichler BJ, Haubner R, Gawaz M, Pfeffer K, Biedermann T, Rocken M. Direct crosstalk between mast cell-TNF and TNFR1-expressing endothelia mediates local tissue inflammation. *Blood* 114: 1696-706, 2009.
55. Knowles MR, Boucher RC. Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *J Clin Invest* 109: 571-7, 2002.
56. Konig 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.
57. Konradova V, Vavrova V, Hlouskova Z, Copova M, Tomanek A, Houstek J. Ultrastructure of bronchial epithelium in children with chronic or recurrent respiratory diseases. *Eur J Respir Dis* 63: 516-25, 1982.
58. Krasteva G, Pfeil U, Filip AM, Lips KS, Kummer W, Konig P. Caveolin-3 and eNOS colocalize and interact in ciliated airway epithelial cells in the rat. *Int J Biochem Cell Biol* 39: 615-25, 2007.
59. Krippner-Heidenreich A, Tubing F, Bryde S, Willi S, Zimmermann G, Scheurich P. Control of receptor-induced signaling complex formation by the kinetics of ligand/receptor interaction. *J Biol Chem* 277: 44155-63, 2002.

60. Lee R, Forrest J. Structure and function of cilia. In: *The Lung: Scientific Foundations*. Lippincott-Raven, Philadelphia: Crystel, RG; West, JB; Weibel, ER, p. 459-478, 1997.
61. Legler DF, Micheau O, Doucey MA, Tschopp J, Bron C. Recruitment of TNF receptor 1 to lipid rafts is essential for TNF $\alpha$ -mediated NF- $\kappa$ B activation. *Immunity* 18: 655-64, 2003.
62. Leigh MW, Pittman JE, Carson JL, Ferkol TW, Dell SD, Davis SD, Knowles MR, Zariwala MA. Clinical and genetic aspects of primary ciliary dyskinesia/Kartagener syndrome. *Genet Med* 11: 473-87, 2009.
63. 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.
64. Li D, Shirakami G, Zhan X, Johns RA. Regulation of ciliary beat frequency by the nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate signaling pathway in rat airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 23: 175-81, 2000.
65. Lima C, Souza VM, Soares AL, Macedo MS, Tavares-de-Lima W, Vargaftig BB. Interference of methysergide, a specific 5-hydroxytryptamine receptor antagonist, with airway chronic allergic inflammation and remodelling in a murine model of asthma. *Clin Exp Allergy* 37: 723-34, 2007.
66. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104: 487-501, 2001.
67. MacEwan DJ. TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences. *Cell Signal* 14: 477-92, 2002.
68. McFarlane SM, Jupp OJ, Cobban HJ, Hunter I, Anderson HM, Vandenabeele P, Nixon GF, MacEwan DJ. Stimulation of stress-activated but not mitogen-activated protein kinases by tumour necrosis factor receptor subtypes in airway smooth muscle. *Biochem Pharmacol* 61: 749-59, 2001.
69. Micheau O, Tschopp J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 114: 181-90, 2003.
70. Mio Y, Adachy Y. Modulation of IL-8 release from human bronchial epithelial cells by tumor necrosis factor alpha, endotoxin and cigarette smoke. *Am J Respir Critical Care Med* 149: A1070, 1994.
71. Mitic LL, Van Itallie CM, Anderson JM. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions I. Tight junction structure and function: lessons from mutant animals and proteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279: G250-G254, 2000.
72. Moffatt JD, Cocks TM, Page CP. Role of the epithelium and acetylcholine in mediating the contraction to 5-hydroxytryptamine in the mouse isolated trachea. *Br J Pharmacol* 141: 1159-66, 2004.
73. Mussatto DJ, Garrard CS, Lourenco RV. The effect of inhaled histamine on human tracheal mucus velocity and bronchial mucociliary clearance. *Am Rev Respir Dis* 138: 775-9, 1988.
74. Nagase T, Dallaire MJ, Ludwig MS. Airway and tissue behavior during early response in sensitized rats: role of 5-HT and LTD4. *J Appl Physiol* 80: 583-90, 1996.

75. Newby CM, Sabin L, Pekosz A. The RNA binding domain of influenza A virus NS1 protein affects secretion of tumor necrosis factor alpha, interleukin-6, and interferon in primary murine tracheal epithelial cells. *J Virol* 81: 9469-80, 2007.
76. 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.
77. Pan J, Yeger H, Cutz E. Innervation of pulmonary neuroendocrine cells and neuroepithelial bodies in developing rabbit lung. *J Histochem Cytochem* 52: 379-89, 2004.
78. Pennica D, Hayflick JS, Bringman TS, Palladino MA, Goeddel DV. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the cDNA for murine tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 6060-4, 1985.
79. Pennica D, Nedwin GE, Hayflick JS, Seeburg PH, Derynck R, Palladino MA, Kohr WJ, Aggarwal BB, Goeddel DV. Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* 312: 724-9, 1984.
80. Pfeffer K, Matsuyama T, Kundig TM, Wakeham A, Kishihara K, Shahinian A, Wiegmann K, Ohashi PS, Kronke M, Mak TW. Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection. *Cell* 73: 457-67, 1993.
81. 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: 450-60, 2010.
82. Robbins RA, Rennard SE. *Biology of Airway Epithelial Cells. The Lung* 2nd edition: 445-57, 1997.
83. Rubin BK. Mucus structure and properties in cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev* 8: 4-7, 2007.
84. Rubin BY, Anderson SL, Sullivan SA, Williamson BD, Carswell EA, Old LJ. High affinity binding of 125I-labeled human tumor necrosis factor (LuKII) to specific cell surface receptors. *J Exp Med* 162: 1099-104, 1985.
85. Ryu JH, Kim CH, Yoon JH. Innate immune responses of the airway epithelium. *Mol Cells* 30: 173-83, 2010.
86. Salathe M, Lieb T, Bookman RJ. Lack of nitric oxide involvement in cholinergic modulation of ovine ciliary beat frequency. *J Aerosol Med* 13: 219-29, 2000.
87. Salathe M, Lipson EJ, Ivonnet PI, Bookman RJ. Muscarinic signaling in ciliated tracheal epithelial cells: dual effects on Ca<sup>2+</sup> and ciliary beating. *Am J Physiol* 272: L301-L310, 1997.
88. Satir P, Christensen ST. Structure and function of mammalian cilia. *Histochem Cell Biol* 129: 687-93, 2008.
89. Satir P, Christensen ST. Overview of structure and function of mammalian cilia. *Annu Rev Physiol* 69: 377-400, 2007.
90. Satir P, Christensen ST. Overview of structure and function of mammalian cilia. *Annu Rev Physiol* 69: 377-400, 2007.

91. Satir P, Sleigh MA. The physiology of cilia and mucociliary interactions. *Annu Rev Physiol* 52: 137-55, 1990.
92. Schliemann M, Bullinger E, Borchers S, Allgower F, Findeisen R, Scheurich P. Heterogeneity reduces sensitivity of cell death for TNF-stimuli. *BMC Syst Biol* 5: 204, 2011.
93. Schulman CI, Wright JK, Nwariaku F, Sarosi G, Turnage RH. The effect of tumor necrosis factor-alpha on microvascular permeability in an isolated, perfused lung. *Shock* 18: 75-81, 2002.
94. Secher T, Vasseur V, Poisson DM, Mitchell JA, Cunha FQ, ves-Filho JC, Ryffel B. Crucial role of TNF receptors 1 and 2 in the control of polymicrobial sepsis. *J Immunol* 182: 7855-64, 2009.
95. Shimabukuro DW, Sawa T, Gropper MA. Injury and repair in lung and airways. *Crit Care Med* 31: S524-S531, 2003.
96. Sisson JH, May K, Wyatt TA. Nitric oxide-dependent ethanol stimulation of ciliary motility is linked to cAMP-dependent protein kinase (PKA) activation in bovine bronchial epithelium. *Alcohol Clin Exp Res* 23: 1528-33, 1999.
97. Sleigh MA. Kartagener's syndrome, ciliary defects and ciliary function. *Eur J Respir Dis Suppl* 127: 157-61, 1983.
98. Sleigh MA. Primary ciliary dyskinesia. *Lancet* 2: 476, 1981.
99. Sleigh MA. Ciliary function in transport of mucus. *Eur J Respir Dis Suppl* 128 (Pt 1): 287-92, 1983.
100. Sleigh MA, Blake JR, Liron N. The propulsion of mucus by cilia. *Am Rev Respir Dis* 137: 726-41, 1988.
101. Soane MC, Jackson A, Maskell D, Allen A, Keig P, Dewar A, Dougan G, Wilson R. Interaction of Bordetella pertussis with human respiratory mucosa in vitro. *Respir Med* 94: 791-9, 2000.
102. Steffen M, Abboud M, Potter GK, Yung YP, Moore MA. Presence of tumour necrosis factor or a related factor in human basophil/mast cells. *Immunology* 66: 445-50, 1989.
103. Steinfort C, Wilson R, Mitchell T, Feldman C, Rutman A, Todd H, Sykes D, Walker J, Saunders K, Andrew PW, . Effect of Streptococcus pneumoniae on human respiratory epithelium in vitro. *Infect Immun* 57: 2006-13, 1989.
104. Stephens RE, Stommel E. Role of cyclic adenosine monophosphate in ciliary and flagellar motility. *Cell Movement* 1: 299-316, 1989.
105. Stout SL, Wyatt TA, Adams JJ, Sisson JH. Nitric oxide-dependent cilia regulatory enzyme localization in bovine bronchial epithelial cells. *J Histochem Cytochem* 55: 433-42, 2007.
106. Suter PM, Suter S, Girardin E, Roux-Lombard P, Grau GE, Dayer JM. High bronchoalveolar levels of tumor necrosis factor and its inhibitors, interleukin-1, interferon, and elastase, in patients with adult respiratory distress syndrome after trauma, shock, or sepsis. *Am Rev Respir Dis* 145: 1016-22, 1992.



107. Suto H, Nakae S, Kakurai M, Sedgwick JD, Tsai M, Galli SJ. Mast cell-associated TNF promotes dendritic cell migration. *J Immunol* 176: 4102-12, 2006.
108. Tartaglia LA, Ayres TM, Wong GH, Goeddel DV. A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell* 74: 845-53, 1993.
109. Tartaglia LA, Rothe M, Hu YF, Goeddel DV. Tumor necrosis factor's cytotoxic activity is signaled by the p55 TNF receptor. *Cell* 73: 213-6, 1993.
110. Thompson AB, Robbins RA, Romberger DJ, Sisson JH, Spurzem JR, Teschler H, Rennard SI. Immunological functions of the pulmonary epithelium. *Eur Respir J* 8: 127-49, 1995.
111. Tracey KJ, Beutler B, Lowry SF, Merryweather J, Wolpe S, Milsark IW, Hariri RJ, Fahey TJ, III, Zentella A, Albert JD, . Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science* 234: 470-4, 1986.
112. Tracey KJ, Fong Y, Hesse DG, Manogue KR, Lee AT, Kuo GC, Lowry SF, Cerami A. Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nature* 330: 662-4, 1987.
113. Tracey KJ, Wei H, Manogue KR, Fong Y, Hesse DG, Nguyen HT, Kuo GC, Beutler B, Cotran RS, Cerami A, . Cachectin/tumor necrosis factor induces cachexia, anemia, and inflammation. *J Exp Med* 167: 1211-27, 1988.
114. Valdivieso AG, Marin MC, Clauzure M, Santa-Coloma TA. Measurement of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator activity using fluorescence spectrophotometry. *Anal Biochem* 418: 231-7, 2011.
115. Vareille M, Kieninger E, Edwards MR, Regamey N. The airway epithelium: soldier in the fight against respiratory viruses. *Clin Microbiol Rev* 24: 210-29, 2011.
116. Velasquez DJ, Morrow PE. Estimation of guinea pig tracheobronchial transport rates using a compartmental model. *Exp Lung Res* 7: 163-76, 1984.
117. Voynow JA, Rubin BK. Mucins, mucus, and sputum. *Chest* 135: 505-12, 2009.
118. Wajant H, Henkler F, Scheurich P. The TNF-receptor-associated factor family: scaffold molecules for cytokine receptors, kinases and their regulators. *Cell Signal* 13: 389-400, 2001.
119. Wajant H, Scheurich P. Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 2 and its role in TNF signaling. *Int J Biochem Cell Biol* 33: 19-32, 2001.
120. Wanner A. Clinical aspects of mucociliary transport. *Am Rev Respir Dis* 116: 73-125, 1977.
121. Wanner A, Salathe M, O'Riordan TG. Mucociliary clearance in the airways. *Am J Respir Crit Care Med* 154: 1868-902, 1996.
122. Ware CF. The TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev* 14: 181-4, 2003.
123. Weigand LA, Myers AC, Meeker S, Undem BJ. Mast cell-cholinergic nerve interaction in mouse airways. *J Physiol* 587: 3355-62, 2009.

124. Weiterer S, Schulte D, Muller S, Kohlen T, Uhle F, Weigand MA, Henrich M. Tumor necrosis factor alpha induces a serotonin dependent early increase in ciliary beat frequency and epithelial transport velocity in murine tracheae. *PLoS One* 9: e91705, 2014.
125. Worlitzsch D, Tarran R, Ulrich M, Schwab U, Cekici A, Meyer KC, Birrer P, Bellon G, Berger J, Weiss T, Botzenhart K, Yankaskas JR, Randell S, Boucher RC, Doring G. Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway Pseudomonas infections of cystic fibrosis patients. *J Clin Invest* 109: 317-25, 2002.
126. Wyatt TA, Forget MA, Adams JM, Sisson JH. Both cAMP and cGMP are required for maximal ciliary beat stimulation in a cell-free model of bovine ciliary axonemes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 288: L546-L551, 2005.
127. Zhan X, Li D, Johns RA. Expression of endothelial nitric oxide synthase in ciliated epithelia of rats. *J Histochem Cytochem* 51: 81-7, 2003.
128. Zhao KQ, Goldstein N, Yang H, Cowan AT, Chen B, Zheng C, Palmer JN, Kreindler JL, Cohen NA. Inherent differences in nasal and tracheal ciliary function in response to Pseudomonas aeruginosa challenge. *Am J Rhinol Allergy* 25: 209-13, 2011.

## 11 Publikationsverzeichnis

### Veröffentlichung

Sebastian Weiterer, **Dagmar Schulte**, Sabrina Müller, Thomas Kohlen, Florian Uhle, Markus A. Weigand, Michael Henrich *Tumor necrosis factor alpha induces a serotonin dependent early increase in ciliary beat frequency and epithelial transport velocity in murine tracheae* PloS ONE (2014), DOI: 10.1371/journal.pone.0091705

### Posterpräsentationen

Dagmar Schulte, Sebastian Weiterer, Florian Uhle, Markus A. Weigand und Michael Henrich *Einfluss von TNF- $\alpha$  auf die Funktion des trachealen Flimmerepithels* Deutscher Anästhesiecongress (2011), Hamburg

Sebastian Weiterer, Dagmar Schulte, Florian Uhle, Markus A. Weigand und Michael Henrich *TNF- $\alpha$  increases cilia-driven particle transport in the mouse trachea* 10th world congress on inflammation (2011), Paris

## 12 Ehrenwörtliche Erklärung

Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

## **13 Danksagung**

Mein Dank geht an Prof. Dr. Dr. Michael Henrich für die Überlassung des Themas, die Möglichkeit zur Dissertation und die freundliche Unterstützung aus der Abteilung Anästhesiologie, Operative Intensivmedizin und Schmerztherapie, Universitätsklinikum Gießen von Prof. Dr. Markus A. Weigand.

Im Labor der Abteilung Anästhesiologie, Operative Intensivmedizin und Schmerztherapie, Universitätsklinikum Gießen, danke ich Dr. Sebastian Weiterer, Florian Uhle, Astrid Schulte und Ilona Magel.

Im Institut für Anatomie und Zellbiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen danke ich Prof. Dr. Wolfgang Kummer, Dr. Gabriela Krasteva-Christ, Petra Mermer und Lars Wessels.

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

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



*edition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6288-0



9 783835 196288 0