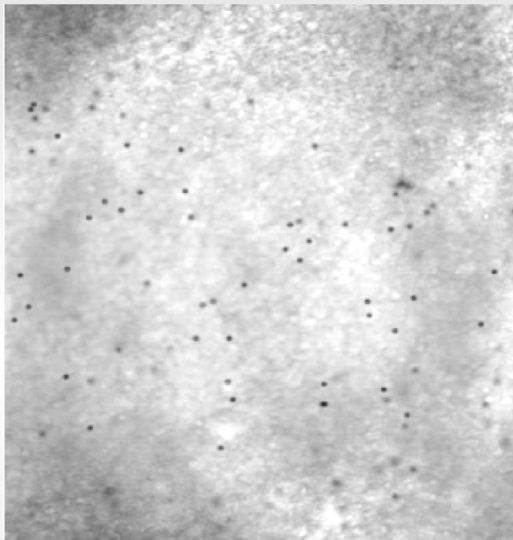


**Untersuchungen zur Charakterisierung der
an der Regulation des ziliären Transports beteiligten
nikotinischen Acetylcholinrezeptoren
im Trachealepithel der Maus**



INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig Universität Gießen

Ariane Weitz

Bibliografische Informationen der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen
Nationalbibliografie;
Detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Auflage 2012

© 2012 by Verlag: **Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH**,
Gießen
Printed in Germany

ISBN 978-3-86345-068-7

Verlag: DVG Service GmbH
Friedrichstraße 17
35392 Gießen
0641/24466
geschaeftsstelle@dvg.net
www.dvg.net

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie und -Biochemie
der Justus-Liebig Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. M. Diener

und

dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
der Justus-Liebig Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. W. Kummer

**Untersuchungen zur Charakterisierung der an der Regulation des
ziliären Transports beteiligten nikotinischen Acetylcholinrezeptoren
im Trachealepithel der Maus**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig Universität Gießen

Eingereicht von
Ariane Weitz
Tierärztin aus Düren

Gießen 2012

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

Gutachter: Prof. Dr. Martin Diener
Prof. Dr. Wolfgang Kummer

Tag der Disputation: 14.02.2012

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
2	LITERATURÜBERSICHT	3
2.1	Trachealepithel	3
2.1.1	Zellen des Trachealepithels	3
2.1.2	Funktionen des Trachealepithels	4
2.1.3	Mukoziliäre Clearance	5
2.1.4	Zilien und Zilienschlag	6
2.1.4.1	Struktur und Aufbau von Zilien	6
2.1.4.2	Zilienschlagfrequenz und -regulation	7
2.1.4.3	Richtung und Metachronie des Zilienschlags	8
2.2	Nikotinische Acetylcholinrezeptoren (nAChR)	10
2.2.1	Struktur der nAChR	10
2.2.2	Signaltransduktion und Funktion nAChR	13
2.2.3	Agonisten, Antagonisten und allosterische Liganden nAChR	14
2.3	Das non-neuronale cholinerge System	16
2.3.1	Funktionen von freigesetztem ACh in der Trachea	17
3	MATERIAL UND METHODEN	19
3.1	Messung der Partikeltransportgeschwindigkeit in der Trachea	19
3.1.1	Versuchstiere	19
3.1.2	Organentnahme	19
3.1.3	Vorbereitung zur Messung	20
3.1.4	Messung	21
3.1.5	Auswertung	24
3.1.6	Statistik	26
3.2	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	27
3.2.1	RNA-Isolierung	27

3.2.2	cDNA-Synthese	27
3.2.3	Durchführung der PCR	28
3.2.4	Auswertung durch DNA-Gelelektrophorese	31
3.2.5	Kontrollreaktionen	31
3.3	Immunhistochemie	32
3.3.1	Versuchstiere	32
3.3.2	Perfusionsfixierung	32
3.3.3	Indirekte Immunfluoreszenz an der Trachea	33
3.3.4	Kontrollreaktionen zu den indirekten Immunfluoreszenzuntersuchungen	34
4	ERGEBNISSE	35
4.1	Messung der PTG in der Trachea von B16-Mäusen	35
4.1.1	PTG nach Zugabe von Nikotin und ATP	35
4.1.2	PTG nach Zugabe von Mecamylamin, Nikotin und ATP	37
4.1.3	Expression der Untereinheiten des nAChR	38
4.2	Charakterisierung der an der Regulation der PTG beteiligten Untereinheiten durch Zugabe selektiver nAChR-Antagonisten	41
4.2.1	PTG nach Zugabe von Dh β E, Nikotin und ATP	41
4.2.1.1	Expression der nAChR α 3-, α 4-, β 2- und β 4-Untereinheiten	43
4.2.2	PTG nach Zugabe von α -BTX, Nikotin und ATP	45
4.2.2.1	Expression der α 7- und α 9-Untereinheit des nAChR	46
4.2.3	PTG nach Zugabe von α -BTX und Dh β E, Nikotin und ATP	48
4.2.3.1	Expression der α 3-, α 4-, α 7-, α 9-, β 2- und β 4-Untereinheiten des nAChRs	48
4.2.4	PTG nach Zugabe von Strychnin, Nikotin und ATP	50
4.2.4.1	Expression der α 10-Untereinheit des nAChR	53
4.2.4.2	Vergleich der Reaktionen auf Nikotin nach Gabe von Strychnin in unterschiedlichen Konzentrationen	54
4.2.5	Vergleich der Reaktionen auf Nikotin nach Gabe von Hepes und den verschiedenen Antagonisten von nAChR-Untereinheiten	55

4.3 Messung der PTG in der Trachea von α3-BAC-transgenen eGFP-Mäusen und ihrem korrespondierenden Kontrollmausstamm	57
4.3.1 PTG bei FVB-Mäusen nach Zugabe von HEPES, Nikotin und ATP	57
4.3.2 PTG bei α 3-BAC-transgenen eGFP-Mäusen nach Zugabe von HEPES, Nikotin und ATP	58
4.3.3 PTG bei α 3-BAC-transgenen eGFP-Mäusen nach Zugabe von Dh β E, Nikotin und ATP	59
4.3.4 Vergleich der Reaktionen auf Nikotin nach Gabe von HEPES und Dh β E bei FVB- und α 3-BAC-transgenen eGFP-Mäusen	60
4.4 Immunhistochemie	61
5 DISKUSSION	63
5.1 Beteiligung der Untereinheiten des nAChR an der Stimulation der PTG im Trachealepithel	63
5.1.1 Einfluss der α 3/4 β 2/4 heteromeren nAChR auf die Stimulation der PTG	65
5.1.2 Einfluss der α 7/ α 9 homomeren nAChR auf die Stimulation der PTG	66
5.1.3 Einfluss der α 9/ α 10-Untereinheiten des nAChR auf die Stimulation der PTG	67
5.2 Beteiligung eines atypischen α10-nAChR an der durch Nikotin induzierten Steigerung der PTG	69
6 ZUSAMMENFASSUNG	72
7 SUMMARY	74
8 LITERATURVERZEICHNIS	76
9 ERKLÄRUNG	88
10 VERÖFFENTLICHUNGEN	89
11 DANKSAGUNG	90

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Abb	Abbildung
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterase
AK	Antikörper
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriophosphat
α -BTX	α -Bungarotoxin
BAC	bacterial artificial chromosome
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
Ca ²⁺	Calzium
CaCl	Calziumchlorid
CaCl ₂ xH ₂ O	Calziumchlorid-2-hydrat
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre DNA
CFTR	Cystische Fibrose Transmembran Regulator
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CGRP	Calcitonin gene-related peptide
ChAT	Cholinacetyltransferase
CHT1	Cholintransporter 1
COPD	chronische obstruktive Lungenerkrankung
CTL	Cholin-spezifisches transporter-ähnliches Protein
d	Distanz
Dh β E	Dihydro- β -erythroidin
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
E	Endpunkt
EC ₅₀	mittlere effektive Konzentration
eGFP	enhanced green fluorescent protein
g	Gramm
h	Stunde

H ₂ O	Wasser
HCl	Wasserstoffchlorid
Hz	Hertz
IgG	Immunglobulin G
IP ₃	Inositoltriphosphat
IT	Immunisierungstag
KCl	Kaliumchlorid
KO	Knock out
l	Liter
M	Molar
M. trachealis	Muskulus trachealis
MD	Median
Mg ²⁺	Magnesium
MgCl	Magnesiumchlorid
MgCl ₂ x2H ₂ O	Magnesiumchlorid-6-hydrat
min	Minute
ml	Milliliter
MR	muskarinischer Rezeptor
mRNA	messenger RNA
ms	Millisekunde
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
MUC-5	Mucin-5
MW	Mittelwert
Na ⁺	Natrium
NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O	Natriumdihydrogenphosphat
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	Natriumhydrogenphosphat
nAChR	nikotinischer Acetylcholinrezeptor
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
nm	Nanometer
n.s.	nicht signifikant

OCT	organischer Kationentransporter
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PFA	Paraformaldehyd
PP	Phosphatpuffer
PTG	Partikeltransportgeschwindigkeit
PTS	particle transport speed
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
s	Sekunden
S	Startpunkt
SB	Standardbedingungen
SEM	standard error of the mean
SPF	spezifisch-pathogen-frei
t	Zeit
Tab	Tabelle
TM	Transmembrane Domäne
v	Geschwindigkeit
vAChT	vesikulärer Acetylcholintransporter
WT	Wildtyp

1 Einleitung

Acetylcholin (ACh) ist im vegetativen Nervensystem und an der neuromuskulären Endplatte bereits lange als klassischer Neurotransmitter bekannt. Dort wird es von Nervenzellen synthetisiert und vermittelt nach Freisetzung seine Wirkung über die Aktivierung nikotinischer (nAChR) und muskarinischer (MR) Acetylcholinrezeptoren auf der Effektorzelle. Darüber hinaus ist seit einigen Jahren bekannt, dass ACh ebenfalls von vielen non-neuronalen Zellen, so auch dem Trachealepithel, synthetisiert und freigesetzt werden kann. Das von non-neuronalen Zellen freigesetzte ACh kann über Bindung an nAChR oder MR der freisetzenden Zelle (autokrin) oder benachbarter Zellen (parakrin) seine Wirkung vermitteln (Grando et al., 2003).

Für die non-neuronalen Zellen des Trachealepithels sind bereits verschiedenste über ACh vermittelte regulatorische Effekte bekannt. So beeinflusst es, über die Aktivierung nAChR und MR die Sekretion von Mucus und Chlorid-Ionen (Kummer et al., 2008; Hollenhorst et al., 2011). In der Pathophysiologie von Asthma und COPD moduliert ACh über die Aktivierung von MR die Zellproliferation sowie weitere Umbauvorgänge in den Atemwegen (Gosens et al., 2004). Darüber hinaus sind MR an der Regulation des Zilienschlags beteiligt (Klein et al., 2009). Durch diesen wird die auf den Zilien liegende Schleimschicht, in der potenzielle Krankheitserreger gebunden werden, Richtung Pharynx transportiert. Dieser Mechanismus wird als Mukoziliäre Clearance bezeichnet und ist entscheidend für die Selbstreinigung der Atemwege. In einer vorangegangenen Promotionsarbeit konnte gezeigt werden, dass durch Stimulation nAChR mittels Nikotin die Partikeltransportgeschwindigkeit (PTG) im Trachealepithel der Maus Zilienvermittelt gesteigert wird (kommuniziert von I. Boseva, Giessen). Da 17 verschiedene Untereinheiten des nAChR existieren, die durch verschiedene Kombinationsmöglichkeiten eine Vielzahl verschiedener Rezeptoren bilden können (Kalamida et al., 2007), wurde in der vorliegenden Arbeit die Beteiligung der Untereinheiten des nAChR an der durch Nikotin stimulierten Steigerung der PTG untersucht. Um aufzuklären, welche dieser Untereinheiten überhaupt im Trachealepithel vorkommen, erfolgte eine Untersuchung der Expression mittels RT-PCR. Die funktionelle Bedeutung dieser Untereinheiten für den Zilien-vermittelten Partikeltransport wurde mithilfe selektiver Antagonisten des nAChR untersucht.

Verschiedene Erkrankungen können eine Störung des Zilienschlags bedingen, die eine gestörte MC zur Folge haben, deshalb können sich aus den Ergebnissen dieser Arbeit wichtige Hinweise für eine mögliche therapeutische Anwendung ergeben.

Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, welche nAChR-Untereinheiten an der Regulation der zilienvermittelten PTG beteiligt sind. Dazu wurden Messungen der PTG an explantierten Mäusertracheen durchgeführt. Zur funktionellen Untersuchung der beteiligten Untereinheiten erfolgte der Einsatz transgener Tiere sowie selektiver Antagonisten nAChR. Im Anschluss an die PTG-Experimente wurde das Trachealepithel abgeschabt und mittels RT-PCR auf die Expression der Untereinheiten untersucht.

2 Literaturübersicht

2.1 Trachealepithel

2.1.1 Zellen des Trachealepithels

Das Trachealepithel ist ein mehrreihiges hochprismatisches Epithel. Es kleidet die luftleitenden Atemwege aus und wird auch als respiratorisches Epithel bezeichnet. Es besteht aus mindestens 12 verschiedenen Epithelzelltypen, deren Vorkommen jedoch zwischen den verschiedenen Spezies variiert (Robbins und Rennart, 1997). Von diesen Zelltypen werden im Folgenden die 6 wichtigsten beschrieben: (1) die zilientragende Zelle, (2) die sekretorische Zelle, (3) die Basalzelle, (4) die Becherzelle, (5) die Bürstenzelle und (6) die neuroendokrine Zelle. Die nachfolgenden prozentualen Angaben über die Häufigkeit des Vorkommens der einzelnen Zelltypen beziehen sich auf das Trachealepithel der Maus.

(1) Die zilientragende Zelle ist, gemeinsam mit der sekretorischen Zelle, der am häufigsten vorkommende Zelltyp des Trachealepithels (36-55% aller Zellen). Sie sitzt der Basalmembran breit auf und an ihrer apikalen Seite befinden sich viele ca. 6 µm lange Zilien, von denen jeweils einzelne von kurzen (1,8 µm) Mikrovilli umgeben sind (Hansell und Moretti, 1969). Die Aufgabe der Zilien ist es, durch gerichtete Schlägen die luftleitenden Atemwege von eingedrungenen Partikeln zu reinigen. Auf die genaue Funktion und Struktur der Zilien wird im Kapitel 2.1.4 näher eingegangen.

(2) Die sekretorische Zelle kommt ebenfalls häufig im Trachealepithel vor (50-60% aller Zellen) (Pack et al., 1980). Sie besitzt zytoplasmatische Vesikel sowie an ihrem apikalen Pol wenige kurze Mikrovilli. Pack et al. (1980) bezeichnen sie aufgrund ihrer histologischen Ähnlichkeit mit den in distalen Atemwegen vorkommenden Clara-Zellen auch als Clara-ähnliche Zellen (*Clara-like cell*) und teilen sie je nach Elektronendichte des Zytoplasmas in 3 unterschiedliche Subtypen ein. Die funktionelle Bedeutung dieser Einteilung ist nicht bekannt. Generell sind sie an der Produktion sekretorischer Proteine, wie dem sekretorischen Clara-Zellen Protein (*Clara cell secretory protein*), beteiligt (Rowe et al., 2004)

(3) Die Basalzellen, die in der Maus 5-10% aller Trachealepithelzellen ausmachen, sitzen unmittelbar der Basalmembran auf und reichen als einzige nicht bis zum Lumen der Trachea (Pack et al., 1980). Sie stellen multipotente Vorläuferzellen dar, die sich in die übrigen Zelltypen ausdifferenzieren können (Hong et al., 2004; Rock et al., 2010).

(4) Die Becherzelle ist in der Maus ein relativ selten auftretender Zelltyp. Lediglich 0,5% aller Trachealepithelzellen sind Becherzellen (Pavelka et al., 1976). Sie ist durch eine besonders große Zahl an Ribosomen sowie an ihrer apikalen Seite gelegene sekretorische Vesikel gekennzeichnet. Ihre Funktion besteht gemeinsam mit submukösen Drüsen in der Produktion von Schleim, der die Oberfläche des Trachealepithels bedeckt (s.a. Kapitel 2.1.3; Pack et al., 1980).

(5) Die Bürstenzelle, die nach den auf ihrem apikalen Pol vorkommenden Büscheln von Mikrovilli benannt ist, agiert nach neuesten Forschungsergebnissen als chemosensorische Zelle. Sie ist in der Lage Bitterstoffe, die unter anderem von bestimmten Bakterien produziert werden, wahrzunehmen und daraufhin eine Herabsetzung der Atemfrequenz zu initiieren (Krasteva et al., 2011).

(6) Neuroendokrine Zellen können solitär oder in Gruppen - dann als sogenannte neuroepitheliale Körper (*neuro-epithelial bodies*) - vorliegen. Ihr Zytoplasma beherbergt viele Vesikel, in denen ATP, Serotonin und verschiedene Neuropeptide wie Calcitonin gene-related peptide (CGRP), Calcitonin, Somatostatin und Substanz P gespeichert sind (Adriaensen et al., 2006). Sehr lange wurde angenommen, dass sie als sauerstoffsensitive Chemorezeptoren agieren, die mit Nervenfasern interagieren (Van Lommel et al., 1999); neuere Untersuchungen zeigen, dass neuro-epitheliale Körper eine komplexe Einheit im respiratorischen Epithel darstellen, von denen vermutet wird, dass sie zahlreiche funktionelle Eigenschaften besitzen. Die genaue Funktion ist jedoch nach wie vor unklar (Brouns et al., 2009). Nachgewiesen wurde jedoch, dass das kleinzellige Lungenkarzinom (*small cell lung carcinoma*) aus diesem Zelltyp entsteht (Sutherland et al., 2011) sowie dass die Zahl neuroendokriner Zellen nach Schädigung des Epithels zunimmt (Parks et al., 2011).

2.1.2 Funktionen des Trachealepithels

Das Trachealepithel steht durch den ununterbrochenen Luftstrom in einem ständigen Kontakt mit der Umwelt und somit auch mit potenziell schädigenden Noxen wie Bakterien, Viren, Partikeln oder toxischen Stoffen.

Durch die Ausbildung von Zellkontakten zwischen den Epithelzellen in Form von Schlussleistenkomplexen und Adhäsionskontakten entsteht eine mechanische Barriere, die ein parazelluläres Eindringen von Mikroorganismen oder Noxen erschwert (Mitic et al., 2000). Eine weitere Funktion dieser Zellkontakte besteht in der Aufrechterhaltung

der Polarität der Zellen. Sie ist Voraussetzung für die Sekretion und Absorption von Ionen und Flüssigkeit (Robins und Rennard, 1997) und deshalb unerlässlich für die Bildung einer korrekt zusammengesetzten Schleimschicht, die für eine effektive mukoziliäre Clearance notwendig ist (Voynow und Rubin; 2009). Weitere Zellkontakte in Form von Gap-Junctions, kanalbildenden Proteinkomplexen, ermöglichen einen direkten Austausch verschiedener Ionen und kleiner Moleküle zwischen benachbarten Trachealepithelzellen. Diese Kommunikation zwischen den Zellen ist bedeutend für die Weiterleitung physiologischer Signale, die unter anderem für die Koordination der Ionen-Sekretion und des Zilienschlags im Trachealepithel erforderlich sind (Boitano und Evans, 2000).

Darüber hinaus sind Trachealepithelzellen in der Lage, mit umliegenden Strukturen und Zellen, entweder auf direktem Wege, also über die Freisetzung von Mediatoren und Transmittern, oder indirekt über Metabolisierung dieser Mediatoren, zu interagieren (Robins und Rennard, 1997). Sie können zum Beispiel ACh synthetisieren und freisetzen, das daraufhin über nAChR und MR verschiedenste regulatorische Effekte, wie z.B. Einfluss auf den Zilienschlag-induzierten Partikeltransport vermittelt (Kummer et al., 2008). Die Beteiligung der muskarinischen Rezeptoren an diesem ist bereits von Klein et al. (2009) beschrieben. Die Rolle der nAChR ist widersprüchlich in der Literatur diskutiert (Irvani und Melville, 1975; Hahn et al., 1992; Agius et al., 1995). Diese wurde in der vorliegenden Arbeit adressiert.

2.1.3 Mukoziliäre Clearance

Als mukoziliäre Clearance wird der Selbstreinigungsmechanismus der Atemwege, der sich aus dem Zusammenspiel zweier Schutzmechanismen ergibt, bezeichnet. Der erste besteht aus der Produktion einer Schleimschicht, die die Oberfläche des Trachealepithels bedeckt. Die Schleimschicht besteht aus 2 Phasen: einer periziliären, wässrigen, die unmittelbar dem Epithel aufliegt, und einer darüberliegenden mukösen, die ihre Beschaffenheit durch den hohen Gehalt an Muzinen (insbesondere MUC-5) erhält (Rubin, 2002). Beide Phasen sind durch eine dünne Schicht Surfactant voneinander getrennt (Robbins und Rennard, 1997). In der mukösen Schicht werden eindringende Partikel und Pathogene gebunden, um ein Vordringen in die distalen Atemwege und die Lunge sowie eine Migration durch das Trachealepithel zu verhindern (Voynow und Rubin, 2009). Dabei erfolgt der Partikeltransport unabhängig von der Partikelgröße (50-6000

nm) (Henning et al., 2010). Die in der Mukusschicht gebundenen Pathogene werden über einen oralwärts gerichtet Zilienschlag, der den zweiten Schutzmechanismus darstellt, entfernt (Knowles und Boucher, 2002). Die Zilien reichen bis in die Mukusschicht und bewegen bei Ausführung des Zilienschlags sowohl die wässrige als auch die muköse Phase mit den in ihr fixierten Pathogenen von den unteren Atemwegen in Richtung Pharynx, wo sie geschluckt oder abgehustet werden können (Matsui et al., 1998). Verschiedene pathophysiologische Mechanismen können die mukoziliäre Clearance einschränken. So führt zum Beispiel die Cystische Fibrose aufgrund einer Genmutation im Cystische Fibrose Transmembran Regulator- (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*, *CFTR*-) Gen zu einer gestörten Chlorid-Sekretion, die Veränderungen in der Zusammensetzung der Schleimschicht zur Folge hat (Riordan, 2008). Dadurch ist der effektive Zilienschlag und somit die mukoziliäre Clearance stark beeinträchtigt (Boucher, 2004). Interessanterweise zeigen neueste Forschungsergebnisse, dass der $\alpha 7$ -nAChR an der Regulation des CFTR-Kanals im Trachealepithel beteiligt ist (Maouche et al., 2011). Ebenfalls auf einer Genmutation beruht die Primäre Ziliäre Dyskinesie (*primary ciliary dyskinesia*). Dort ist die mukoziliäre Clearance aufgrund einer defekten Zilienstruktur- und funktion gestört (Leigh et al., 2009). Des Weiteren können sich bestimmte Bakterien, z.B. der Gattung *Bordetella*, direkt an Zilien des Trachealepithels anheften und deren Funktion stark beeinträchtigen (Edwards et al., 2005). Zusätzlich zu der mechanischen „Bekämpfung“ der Pathogene sezernieren Trachealepithelzellen antimikrobielle Polypeptide in die Schleimschicht, die zur Abwehr beitragen (Ganz, 2002).

2.1.4 Zilien und Zilienschlag

2.1.4.1 Struktur und Aufbau von Zilien

Zilien sind ungefähr 6 μm lange und 0,3 μm breite Zellmembranausstülpungen. Sie bestehen aus einem apikal in der Zelle befindlichen Basalkörperchen, das an einer Basalwurzel verankert ist, und in einen die Zelloberfläche überragenden Schaft übergeht (Lodish et al., 1995).

Generell unterscheidet man primäre und sekundäre Zilien. Sekundäre Zilien befinden sich auf dem Epithel der Atemwege, des Eileiters und der Ductuli efferentes sowie auf Ependymzellen des Gehirns, während primäre Zilien auf Zellen vieler Gewebe vorzu-

finden sind (Lee und Forrest, 1997; Ostrowski et al., 2002). Ausschließlich sekundäre Zilien sind aktiv beweglich (motil), während die unbeweglichen primären Zilien sensorische Fähigkeiten besitzen sowie an interzellulärer Kommunikation beteiligt sind (Singla und Reiter, 2006; Satir und Christensen, 2008).

Der Schaft sekundärer Zilien ist aus 9 Mikrotubulipaaren aufgebaut. Diese sind radiär um 2 zentrale, von einer Scheide umgebene, Einzeltubuli angeordnet. Dieser 9+2 Aufbau wird als Axonem bezeichnet. Primäre Zilien besitzen hingegen keine zentralen Tubuli, weshalb man bei ihnen von einem 9+0 Aufbau spricht. Es existieren jedoch ebenfalls motile Zilien mit einem 9+0, sowie sensorische mit einem 9+2 Aufbau (Ibañez-Tallon et al., 2003). Zur Zilienspitze hin reduziert sich die Zahl der peripheren Tubuli, so dass nur noch 9 einzelne Tubuli peripher angeordnet sind, deren Anzahl im weiteren Verlauf der Zilie bis zu ihrer Spitze ebenfalls abnimmt. An der Zilienbasis gehen die peripheren Mikrotubuluspaare in das Basalkörperchen über (Lee und Forrest, 1997). Die 9 Mikrotubulipaare im Axonem bestehen aus einem 13 Protofilamente umfassenden A-Tubulus, an den sich ein aus 10 Protofilamenten aufgebauter B-Tubulus anschließt. An jedem A-Tubulus sind 2 Dyneinarme - ein äußerer und ein innerer - verankert. Die Dyneinarme bestehen aus Polypeptiden verschiedener Größe - schweren (400-500 kDa), intermediären (45-110 kDa) und leichten (8-55 kDa) Ketten - und besitzen ATPase Aktivität, die sie zur aktiven Bindung an die benachbarten B-Tubuli befähigt (Lee und Forrest, 1997). Wiederholtes Binden und Ablösen führt zu einer gleitenden Bewegung der Mikrotubuli, aus welcher sich der Zilienschlag ergibt (Satir und Christensen, 2008). Die Tubulipaare sind über Nexine mit den benachbarten Tubulipaaren und über am A-Tubulus verankerte Radiärspeichen mit der Scheide des zentralen Tubuluskomplex verbunden. Radiärspeichen und Nexine sind nicht direkt an der Ausführung des Zilienschlags beteiligt, beeinflussen jedoch als limitierender und regulierender Faktor die gleitende Bewegung der Mikrotubuli (Ibañez-Tallon et al., 2003).

2.1.4.2 Zilienschlagfrequenz und -regulation

Der Zilienschlag lässt sich in drei Phasen unterteilen: einen effektiven Schlag, einen Rückholschlag und eine Erholungsphase (Sanderson et al., 1992). Beim vertikal gerichteten, effektiven Schlag reichen die Zilien bis in die muköse Schicht und treiben die Schleimschicht durch ihre Bewegung vorwärts in Richtung Pharynx (Satir und Christensen, 2007). In der sich anschließenden Erholungsphase liegen die Zilien annähernd

parallel zur Zelloberfläche und in Richtung des Mukustransports. Beim darauf folgenden Rückholschlag erfolgt eine rückwärts gerichtete Bewegung der Zilien, die sich in dieser Phase zum größten Teil in der periziliären, wässrigen Flüssigkeit befinden (Salathe, 2007). Dabei wird der effektive Schlag mit einer 2- bis 3fach höheren Geschwindigkeit als der Rückholschlag durchgeführt. Eine Erhöhung der Zilienschlagfrequenz wird über eine Verkürzung der 3 Phasen erreicht, am meisten ist hiervon die Erholungsphase betroffen (Salathe, 2007). Der Mechanismus der Frequenzregulierung wird von den äußeren Dyneinarmen über eine cAMP-abhängige Phosphorylierung einer leichten Kette durchgeführt, während die inneren Dyneinarme für die Schlagform verantwortlich sind (Satir und Christensen, 2008).

Nach der *Switch-Point-Hypothese* wird das Axonem in 2 verschiedenen Einheiten unterteilt. Die erste Einheit besteht aus den Tubuluspaaren 1-4 und 9 und ist verantwortlich für die Durchführung des effektiven Schlags, während sich die zweite Einheit aus den Tubuluspaaren 5-8 zusammensetzt und den Rückholschlag generiert (Satir und Matsuoka, 1989). Daraus resultieren die funktionell unterschiedlichen Bewegungsprofile beim effektiven Schlag und beim Rückholschlag. Der Wechsel von der 1. zur 2. Einheit repräsentiert den so genannten „Umschalt-Punkt“ (*Switch-Point*); dort erfolgt die Erholungsphase (Satir und Christensen, 2007).

Die Zilienschlagfrequenz wird durch mechanische Reizung, chemische Stimuli wie pH-Wert, Temperatur, Luftfeuchtigkeit, aber auch Viskosität der Schleimschicht sowie durch nervale Stimulation oder Zugabe von Pharmaka beeinflusst (Sleigh, 1983; Gheber et al., 1998). Deren Wirkung wird über die Freisetzung von sekundären Botenstoffen (*second messenger*) wie cAMP, cGMP oder Ca^{2+} vermittelt (Zagoory et al., 2002; Satir und Christensen, 2007).

2.1.4.3 Richtung und Metachronie des Zilienschlags

Während der Ziliogenese wandern die Basalkörperchen in Richtung des apikalen Zellpols und verankern sich dort ohne gerichtete Anordnung (Hagiwara et al., 2004). Die sich daraus entwickelnden Zilien wachsen dementsprechend ebenfalls in willkürliche Ausrichtung. Erst im Endstadium der Ziliogenese, wenn die Zilien voll entwickelt sind und zu schlagen beginnen, erfolgt eine Neuausrichtung durch Rotation der Basalkörperchen aller Zilien in eine gemeinsame Richtung (Guirao und Joanny, 2007). Die gemeinsame Anordnung und somit Schlagrichtung der Zilien sind Voraussetzung für einen ef-

fektiven Partikeltransport in der Trachea (Wanner et al., 1996). Dieser liegt jedoch nur vor, wenn zusätzlich zwischen benachbarten Zilien eine zeitlich versetzte Koordination der Schläge vorliegt. Diese zeitlich versetzte Schlagabfolge wird als Metachronismus bezeichnet und entsteht durch hydrodynamische Interaktion benachbarter Zilien. Diese Interaktion wird durch Scherkräfte, die bei der Bewegung der Schleimschicht entstehen, vermittelt (Ricka, 2010).

Bei Erkrankungen wie der Primären Ziliären Dyskinesie sind die Basalkörper wahllos angeordnet und die Axoneme unvollständig, so dass keine normale Zilienaktivität möglich ist (Guirao und Joanny, 2007).

2.2 Nikotinische Acetylcholinrezeptoren (nAChR)

2.2.1 Struktur der nAChR

Nikotinische AChR gehören, ebenso wie Glycin-, GABA-A- und 5HT₃-Serotonin Rezeptoren zur Familie der Cys-loop Rezeptoren (Tsetlin et al., 2011). Alle Rezeptoren, die dieser Gen-Superfamilie angehören, bilden in der Zellmembran lokalisierte Ligan- den-gesteuerte Ionenkanäle, durch die beim Einströmen von Ionen das Membranpotenzial verändert wird. Der Ionenkanal ist ein Pentamer, das aus 5 um eine Zentralpore arrangierten Untereinheiten gebildet wird.

Insgesamt 17 verschiedene Untereinheiten der nAChR sind bis heute bekannt: $\alpha 1$ - $\alpha 10$, $\beta 1$ - $\beta 4$, γ , δ , ϵ (Kalamida et al., 2007). Nach ihrer vorrangigen Expression werden die nAChR in 2 Subtypen, den muskulären und den neuronalen Typ, unterteilt, wobei der letztere ebenfalls in vielen non-neuronalen Geweben vorkommt (Albuquerque et al., 2009). Beim Muskeltyp unterscheidet man den an der adulten ($(\alpha 1)_2\beta 1\epsilon\delta$) motorischen Endplatte vorkommenden Rezeptor von dem fetalen ($(\alpha 1)_2\beta 1\delta\gamma$) Rezeptor (Wonnacott und Barik, 2007). Die nAChR vom neuronalen Typ bilden entweder Homopentamere aus den Untereinheiten $\alpha 7$, $\alpha 8$, $\alpha 9$, wobei die Untereinheit $\alpha 8$ bisher ausschließlich in Vögeln nachgewiesen wurde, oder Heteropentamere. Diese sind zusammengesetzt aus den Untereinheiten $\alpha 9\alpha 10$ sowie aus $\alpha 2$ - $\alpha 6$ und $\beta 2$ - $\beta 4$ (Abb. 2.1), woraus sich eine Vielzahl verschiedener Kombinationsmöglichkeiten ergibt (Millar und Gotti, 2009). Weiterhin werden die neuronalen nAChR, abhängig von ihren verschiedenen Fähigkeiten Liganden zu binden unterteilt in alpha-Bungarotoxin- (α -BTX-) bindende, zu denen die Homomere $\alpha 7$, $\alpha 8$, $\alpha 9$ gehören, und nicht- α -BTX bindende, zu welchen aus $\alpha 2$ - $\alpha 6$ und $\beta 2$ - $\beta 4$ aufgebaute Heteromere zählen (Kalamida et al., 2007).

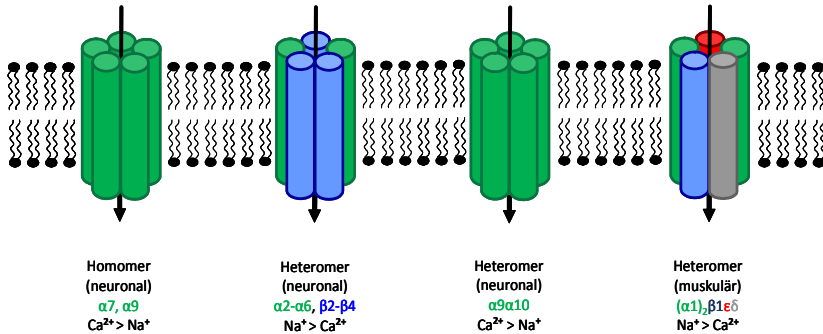


Abb. 2.1: Schematische Darstellung des Aufbaus nAChR vom neuronalen Typ. Jeder nAChR besteht aus 5 Untereinheiten. Dargestellt sind die möglichen Zusammensetzungen der Untereinheiten sowie die Ionen-Durchlässigkeit der verschiedenen Rezeptorsubtypen.

Jede einzelne Untereinheit besteht aus einer extrazellulären, einer transmembranen und einer intrazellulären Domäne. Die extrazelluläre Domäne wird von 210-220 Aminosäuren gebildet, die ein N-terminales Fragment sowie die Cys-Schleife (*Cys-loop*) enthalten. Bei dem die Superfamilie benennenden Cys-loop handelt es sich um zwei Cysteinreste, die durch 13 Aminosäuren voneinander getrennt sind und über eine Disulfidbrücke eine Schleife (*loop*) bilden. Die transmembrane Domäne besteht aus 4 hydrophoben Segmenten TM1-TM4, von denen die Segmente TM1 und TM2 sowie TM2 und TM3 über kurze hydrophile Schleifen miteinander verbunden sind. Die beiden Segmente TM3 und TM4 sind über die intrazelluläre Domäne, eine Schleife von 100-150 Aminosäuren, die eine Phosphorylierungsstelle beinhalten, miteinander verbunden. Das Ende jeder Untereinheit wird von einem aus 4-28 Aminosäuren bestehenden C-terminalen extrazellulären Segment, das an TM4 hängt, gebildet (Abb. 2.2) (Tsetlin et al., 2011). Die transmembranen Segmente sind im Rezeptorkomplex so angeordnet, dass die Pore des Ionenkanals von den TM2 aller 5 Untereinheiten ausgekleidet wird, während die TM4 Segmente mit der Lipiddoppelschicht interagieren (Albuquerque et al., 2009).

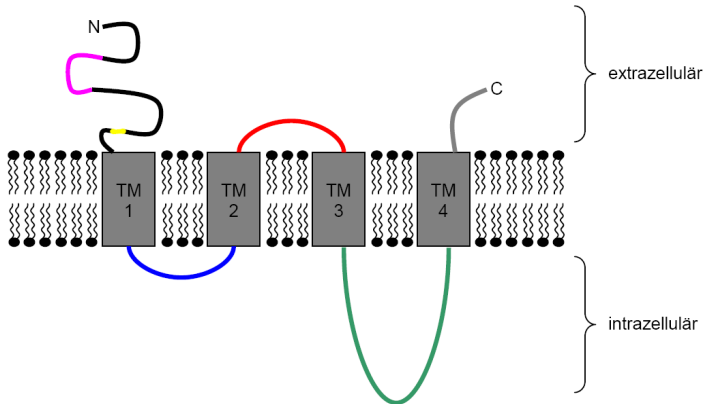


Abb. 2.2: Schematische Darstellung des Aufbaus der einzelnen nAChR-Untereinheit. Jede Untereinheit besteht aus einer extrazellulären, einer transmembranen und einer intrazellulären Domäne. Die extrazelluläre Domäne beinhaltet das N-terminale Fragment (schwarz), die Cys-Schleife (rosa) und das Cys-Cys Paar (gelb). Die transmembrane Domäne besteht aus den Segmenten TM1-TM4. Kurze hydrophile Schleifen verbinden die Segmente TM1 und 2 (blau) sowie TM2 und 3 (rot). Die intrazelluläre Domäne verbindet TM3 und 4 (grün). An TM 4 hängt das C-terminale Fragment (grau).

Je nach Vorhandensein einer Bindungsstelle für Agonisten und kompetitive Antagonisten erfolgt die Unterscheidung in α - und β -Untereinheiten. Die Ligandenbindungsstelle in Form des Cys-Cys Paares, eine Disulfid Brücke zwischen zwei angrenzenden Cystein-Resten, befindet sich in der extrazellulären Domäne der α -Untereinheit, nah am Übergang zu TM1. Aus diesem Grund besitzen α -Homomere mehr Ligandenbindungsstellen als Heteromere bestehend aus α - und anderen Untereinheiten (Albuquerque et al., 2009). Des weiteren liegt die Ligandenbindungsstelle in einer „Tasche“, deren Vorderseite das Cys-Cys Pair der α -Untereinheit $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 6$, $\alpha 7$ oder $\alpha 9$ darstellt und deren Rückseite von mindestens 3 Aminosäuren der $\alpha 10$ -, $\beta 2$ -, $\beta 4$ -, δ -, γ - oder ϵ -Untereinheit gebildet wird. Die Untereinheiten $\alpha 5$, $\beta 1$ und $\beta 3$ nehmen im Rezeptorkomplex die Position der 5. Untereinheit ein, das heißt, dass sie nicht an der Formation der Ligandenbindungsstelle beteiligt sind. Somit besitzen die Untereinheiten $\alpha 5$ und $\alpha 10$ entgegen der Definition keine eigene Ligandenbindungsstelle. Generell entscheidet der

Aufbau der „Vorderseite“ über die Liganden-Selektivität während der Aufbau der „Rückseite“ die Liganden-Affinität bestimmt (Kalamida et al., 2007).

2.2.2 Signaltransduktion und Funktion nAChR

Der Rezeptor kann in 3 verschiedenen Zuständen vorliegen: einem ruhenden und geschlossenen, einem aktiven und geöffneten, und einem desensitivierten und geschlossenen (Bertrand und Gopalakrishnan, 2007). Im aktiven Zustand hat der Rezeptor eine niedrige Affinität zu Agonisten, während er im desensitivierten zwar refraktär ist, jedoch eine hohe Affinität für Agonisten, wie z.B. ACh und Nikotin und manche Antagonisten, wie d-Tubocurarin aufweist. Diese Affinitäten verschiedener Agonisten zu verschiedenen Zuständen des Rezeptors bedingen eine Stabilisierung der jeweiligen Rezeptorkonformation nach Bindung verschiedener Liganden (Arneric und Holladay, 2000).

Die Bindung eines Agonisten an die Ligandenbindungsstelle induziert eine Rotation der extrazellulären Domäne, die in eine Rotation der TM2-Helix umgewandelt wird. Dies bewirkt eine Konformationsänderung des Rezeptors, durch die der Kanal geöffnet und somit die Ionenpassage ermöglicht wird. Die Öffnung des Kanals geschieht innerhalb von Millisekunden nach Ligandenbindung. Dabei ist die schnelle Konformationsänderung des Rezeptors abhängig von einer intakten Proteinsequenz. Eine Störung dieser Sequenz hat Erkrankungen wie bestimmte Formen von Epilepsie oder Myasthenia-Syndrome zur Folge (Albuquerque et al., 2009). Der geöffnete Kanal lässt ausschließlich Kationen durchtreten (Tsetlin et al., 2011). Vor allem die TM2-Helix der transmembranen Domäne bestimmt die Ionen-Selektivität des Rezeptors (Albuquerque et al., 2009). Jedoch zeigen andere Studien, dass sowohl die extrazelluläre als auch die intrazelluläre Domäne ebenfalls Einfluss hierauf haben (Song und Corry, 2009). Demzufolge ist die Selektivität für bestimmte Kationen abhängig von der Zusammensetzung der Untereinheiten.

Während α -BTX bindende Rezeptoren und unter denen am meisten $\alpha 7$ (Fucile, 2004) sowie der $\alpha 9\alpha 10$ Heteromer-Rezeptor besonders permeabel für Ca^{2+} sind (Weisstaub et al., 2002), weisen die nicht α -BTX bindenden neuronalen nAChR sowie die muskulären nAChR eine geringere Permeabilität für Ca^{2+} als für Na^+ auf (vgl. Abb. 2.1) (Albuquerque et al.; 2009, Gotti und Clementi, 2004). Die durch den Kanal einströmen-

den Kationen bewirken eine Änderung des Membranpotenzials. Darüber hinaus können einströmende Ca^{2+} -Ionen sekundäre Botenstoffe aktivieren und über diese Aktivierung Effekte auf die Ausschüttung von Neurotransmittern, die Genexpression oder den Zellmetabolismus erzielen (Kalamida et al., 2007).

Nach Aktivierung und Öffnung des nAChR durch den Agonisten geht der Rezeptor in den desensitivierten, geschlossenen Zustand über und ist bis zum Übergang in den ruhenden Zustand nicht durch Agonisten erregbar (Arias, 2010; Arneric und Holladay, 2000).

2.2.3 Agonisten, Antagonisten und allosterische Liganden nAChR

Die unterschiedliche Zusammensetzung und Stöchiometrie der Untereinheiten beeinflussen nicht nur die Ionen-Selektivität, sondern weisen ebenfalls unterschiedliche Affinitäten für Liganden auf (Kalamida et al., 2007). ACh ist ein natürlicher Ligand des nAChR, der mit gleichartiger Sensitivität an die Ligandenbindungsstelle der verschiedenen nAChR bindet und den Rezeptor aktiviert. Nikotin ist ein Agonist am nAChR, der an derselben Stelle bindet wie ACh und ebenfalls eine Aktivierung des Rezeptors zur Folge hat. Im Gegensatz zu ACh, das nach Rezeptorbindung einer sofortigen Entfernung und dem Abbau durch Acetylcholinesterase (AChE) unterliegt, bleibt die Bindung von Nikotin am Rezeptor aufrechterhalten und führt zu einer anhaltenden Desensitivierung oder sogar einer kompletten Rezeptorinaktivierung (Lester, 2009; Gahring und Rogers, 2005). Ein weiterer Unterschied zu ACh besteht darin, dass Nikotin mit unterschiedlicher Affinität an verschiedene Rezeptorkomplexe bindet. So zeigt es größere Wirksamkeit an neuronalen als an muskulären nAChR (Lester, 2009). Des Weiteren besteht innerhalb der neuronalen Rezeptoren eine höhere Selektivität zu heteromeren als homomeren Rezeptoren (Wonnacott und Barik, 2007).

Die Antagonisierung basiert auf unterschiedlichen Prinzipien, daher ist die Dauer unterschiedlich. Als kompetitive Antagonisten werden Liganden bezeichnet, die mit den Agonisten um dieselbe Bindungsstelle konkurrieren, jedoch bei Bindung nicht zu einer Aktivierung des Rezeptors führen. Dazu zählen unter anderem α -BTX, das Toxin der Schlange *Bungarus multicinctus*, das selektiv an nAChR vom muskulären Typ sowie an die $\alpha 7$ - und $\alpha 9$ -Homomere des neuronalen nAChR-Typs bindet, Strychnin, ein Glycin-Rezeptor-Antagonist, der ebenfalls selektiv an den nAChR $\alpha 9\alpha 10$ bindet, und Dihydro- β -erythroidin (Dh β E), ein Alkaloid der *Erythrina* Pflanze, das konzentrationsabhängig

an die Rezeptoren $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 3\beta 2$ oder $\alpha 3\beta 4$ bindet (Wonnacott und Barik, 2007). Dabei weist Dh β E eine 7500fach höhere Affinität zu $\alpha 4\beta 2$ - im Vergleich zu $\alpha 3\beta 4$ -nAChR auf (Xiao et al., 1998).

Neben der Ligandenbindungsstelle für Agonisten und Antagonisten besitzen nAChR allosterische Bindungsstellen, die überall am Rezeptorproteinkomplex lokalisiert sein können. Liganden, die an diese Bindungsstellen binden, bewirken durch Modifizierung der Energieschwelle entweder eine Verstärkung (positive allosterische Modulatoren) oder Abschwächung (negative allosterische Modulatoren) der durch Agonisten induzierten Antwort (Bertrand und Gopalakrishnan, 2007). Zu den positiven allosterischen Modulatoren zählen zum Beispiel das Antihelmintikum Ivermectin, das eine Steigerung des durch ACh induzierten Ionenstroms sowie eine Reduzierung der Desensitivierungszeit und der mittleren effektiven Konzentration (EC_{50} -Werte) für ACh am $\alpha 7$ -Rezeptor bewirkt (Bertrand und Gopalakrishnan, 2007). Negative allosterische Modulatoren, wie Mecamylamin, das größere Affinität zu heteromeren als zu homomeren nAChR aufweist, interagieren mit Aminosäuren des TM2 Komplexes im Lumen des nAChR-Kanals und führen so zu einer sterischen Blockade des Ionenstroms (Arneric und Holladay, 2000).

2.3 Das non-neuronale cholinerge System

ACh ist bekannt als der erste klassische Neurotransmitter, der 1921 von Loewi entdeckt wurde. Es wird von cholinergen Neuronen synthetisiert, gespeichert und freigesetzt. Seine Wirkung vermittelt es an der Effektorzelle über nikotinische und muskarinische Acetylcholinrezeptoren. Diese Mechanismen zusammen werden als neuronales cholinerges System bezeichnet. Darüber hinaus existiert ein cholinerges System auch in nicht-neuronalem Gewebe von Säugetieren (Sastry und Sadavongvivad, 1978; Wessler et al, 1998), welches in Abgrenzung zum neuronalen als *non-neuronales cholinerges System* bezeichnet wird. ACh stellt einen phylogenetisch sehr alten Botenstoff dar, der seit über 3 Milliarden Jahren die physiologischen Funktionen von Bakterien, Pflanzen, Pilzen, Schwämmen und wirbellosen Tieren moduliert (Wessler, 1999; Horiuchi et al., 2003; Kawashima et al., 2007). Im Vergleich dazu ist die Spanne von einer halben Milliarde Jahren, die ACh als Neurotransmitter agiert, relativ kurz (Grando et al., 2003). Im Laufe der Evolution entwickelte sich ACh von einem intrazellulär über einen auto- und parakrin wirkenden Botenstoff zu einem Neurotransmitter (Wessler et al., 1998). Dieser Entwicklungsverlauf erklärt die teilweise unterschiedlichen Aufnahme-, Synthese- und Freisetzungsmechanismen von Acetylcholin in non-neuronalen und neuronalen Geweben, die im entwicklungsbiologisch älteren non-neuronalen System z.T. weniger effektiv und spezialisiert als im neuronalen cholinergen System sind (Kummer et al., 2008): Im neuronalen cholinergen System erfolgt die Aufnahme von Cholin aus dem Extrazellulärraum über den Cholintransporter 1 (CHT1), der Cholin mit hoher Affinität bindet. Die Expression von CHT1 konnte ebenfalls auf verschiedenen non-neuronalen Zellen, so zum Beispiel auf Trachealepithelzellen (Pfeil et al., 2003) und Keratinozyten der Haut (Haberberger et al., 2002) nachgewiesen werden. Darüber hinaus existieren weitere Möglichkeiten zur Aufnahme von Cholin in die Zelle. Zum einen gibt es Cholin-spezifische transporter-ähnliche Proteine (CTL-Familie), die mit mittlerer Affinität Cholin binden, und zum anderen die Organische Kationen Transporter (OCT-Familie), von denen OCT 1 und 2 mit niedriger Affinität Cholin binden und transportieren (Michel et al., 2006). Nach einer Aufnahme von Cholin in die Zelle erfolgt in neuronalen Geweben die Synthese von Acetylcholin aus Cholin und Acetyl-CoA über das Enzym Cholinacetyltransferase (ChAT). In Zellen des respiratorischen Epithels (Klapproth et al., 1997), in der Bürstenzelle (Krasteva et al., 2011), in chemosensorischen Zellen des Vo-

mero-nasalorgans (Ogura et al., 2010) sowie in weiteren Zelltypen konnte ebenfalls ChAT nachgewiesen werden. Eine weitere, wenngleich weniger effektive Synthesemöglichkeit von ACh in non-neuronalen Zellen wird über das Enzym Carnitinacetyltransferase katalysiert (Tucek, 1982).

In neuronalen Geweben wird ACh nach der Synthese über den vesikulären Acetylcholintransporter (VACHT) in Vesikel gepackt (Arvidsson et al., 1997). Nach einem eintreffenden Aktionspotenzial mit nachfolgender Depolarisierung der Zellmembran kann daraufhin über Exozytose die Freisetzung von ACh erfolgen. Im non-neuronalen cholinergen System wird VACHT nicht in allen Zellen exprimiert. Stattdessen haben viele Zellen die Möglichkeit der direkten Freisetzung von ACh über die OCTs oder über Mediatophore. Die letzteren sind porenbildende Proteine in der Zellmembran (Falk-Vairant et al., 1996). Im Atemwegsepithel exprimieren Becherzellen (Lips et al., 2005) sowie Bürstenzellen (Krasteva et al., 2011) VACHT. In zilienträgenden Zellen konnte die Expression von OCT1-3 gezeigt werden (Lips et al., 2005). Bei Versuchen an transfizierten Oozyten wurde eine ACh-Freisetzung nur über OCT1 und 2 nachgewiesen (Lips et al., 2005), während an der humanen Plazenta eine ACh-Freisetzung über OCT1 und 3 beschrieben wurde (Wessler et al., 2001). Diese Ergebnisse müssen jedoch nicht in direktem Gegensatz zueinander gesehen werden, da es sich um zwei völlig unterschiedliche Systeme handelt. So ist es möglich, dass bei den Oozyten keine ACh-Freisetzung über OCT3 nachgewiesen werden konnte, da es sich hierbei um ein artifizielles System handelt, in dem ausschließlich die transfizierten Proteine vorliegen. Sollte OCT3 ein weiteres Protein für die ACh-Freisetzung benötigen, wäre eine solche Interaktion nur in der Plazenta und nicht in den Oozyten möglich.

2.3.1 Funktionen von freigesetztem ACh in der Trachea

Es wird angenommen, dass das von den Trachealepithelzellen freigesetzte ACh seine Wirkung auto- und parakrin sowohl über muskarinische als auch über nikotinische Rezeptoren, die ebenfalls auf den Trachealepithelzellen exprimiert werden, vermittelt (Salathe et al., 1997; Maus et al., 1998; Gosens et al., 2006; Kummer et al., 2008). Dort hat es Einfluss auf die Regulation der Zellproliferation, die Sekretion von Chlorid-Ionen und Mukus und die Stimulation der Zilienschlagfrequenz sowie Beteiligung an der Pathophysiologie bei COPD (Gosens et al., 2006; Racke et al., 2006; Kummer et al., 2008; Klein et al., 2009).

Neuronal freigesetztes ACh wird im Extrazellularraum rasch enzymatisch von AChE in Acetat und Cholin abgebaut (Massoulié et al., 2008). Die AChE wird von den cholinergen Neuronen synthetisiert, so dass sichergestellt ist, dass genügend Abbaukapazität vorhanden ist, um ACh nach dessen Freisetzung schnell aus dem Intrazellularraum zu entfernen. Ein weiteres, wenn auch unspezifischeres Enzym für den Abbau von ACh ist die Butyrylcholinesterase (Darvesh et al., 2003). Im non-neuronalen cholinergen System wird die AChE-Aktivität jedoch als gering beschrieben, wodurch sichergestellt ist, dass die im Vergleich zu Neuronen geringe ACh-Sekretion ausreicht, um auto- und parakrine Signaltransduktion zu gewährleisten (Wessler et al., 2003; Kummer et al., 2008).

3 Material und Methoden

3.1 Messung der Partikeltransportgeschwindigkeit in der Trachea

3.1.1 Versuchstiere

Bei den Versuchstieren handelte es sich um Mäuse beiderlei Geschlechtes mit dem genetischen Hintergrund C57/Bl6. Die Mäuse stammten aus einer spezifiziert-pathogenfreien Haltung (SPF; Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland). Weiterhin wurden BAC (bacterial artificial chromosome) transgene $\alpha 3\beta 4\alpha 5$ -Mäuse, in denen enhanced green fluorescent protein (eGFP) unter der Kontrolle der endogenen $\alpha 3$ -nAChR-Untereinheit-Promotoraktivität exprimiert wird ($\alpha 3$ -BAC-transgene eGFP-Mäuse; Dr. Ibañez-Tallon, Berlin) und deren korrespondierende Wildtypmäuse der Linie FVB verwendet, die aus der Zucht des Physiologischen Instituts der Justus-Liebig-Universität Giessen (Standardbedingungen; SB) stammten. Alle Versuchstiere hatten ein Alter von mindestens 15 Wochen und wurden durch Inhalation einer Überdosis Isofluran (Baxter GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) getötet.

3.1.2 Organentnahme

Zu Beginn der Präparation wurden das Abdomen und der Thorax der Maus über einen Schnitt in der Medianlinie eröffnet. Der Schnitt wurde kranial der Apertura thoracica bis zum Kehlkopfbereich fortgesetzt. Durch die Entfernung der infrahyalen Muskulatur wurde die Trachea freigelegt. Danach wurde das verbliebene Bindegewebe, Fett, Blutgefäße und Ösophagus abpräpariert und die Trachea caudal des Kehlkopfes und kranial der Bifurkation durchtrennt und mittig in ein mit kaltem HEPES-Ringer-Puffer (Tab. 3.1) gefülltes Delta T Kulturschälchen (Bioptechs, Butler, USA) gelegt, welches zuvor mit Sylgard 184 (Dow Corning GmbH, Wiesbaden, Deutschland), ein klares Silikonelastomer, ausgegossen wurde. Zur Herstellung des Sylgardgels wurden Sylgard 184 Base und Sylgard 184 Härter im Verhältnis 9:1 angesetzt und mindestens 2 h bei Raumtemperatur unter dem Abzug verrührt. Um beim Rührvorgang entstandene Luftblasen mittels Vakuum zu entfernen, wurde das Gemisch für 2 h in einen Exsikkator gegeben. Nach der Reinigung der Oberfläche des Delta T Kulturschälchens mit 70 % Ethanol wurden mittig 1,2 ml - 1,5 ml des hergestellten Gels aufgetragen und zur Auspolymerisierung bei 60°C über Nacht in den Wärmeschrank gestellt.

Die Fixierung der Trachea im Delta T Kulturschälchen erfolgte durch Minutien (Fiebig Lehrmittel, Berlin, Deutschland), welche ins Sylgardgel gesteckt wurden. Mit einer Minute an jedem Ende wurde die Trachea unter leichter Spannung und mit dem *M. trachealis* nach oben aufgespannt. Die Trachea wurde entlang des *M. trachealis* aufgeschnitten, indes sorgfältig darauf geachtet wurde, das gegenüberliegende Epithel nicht zu perforieren. Um eventuell verbliebene Gewebereste zu entfernen, wurde die Trachea ein zweites Mal mit kaltem HEPES-Ringer-Puffer gewaschen.

0,418 g	Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
7,97 g	Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
1,96 g	Glukose	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
2,38 g	HEPES	Sigma-Aldrich GmbH
1,0 ml	1 M Magnesiumchlorid-6-hydratlösung ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)	Merck KGaA
2,2 ml	1 M Calciumchlorid-2-hydratlösung ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	Merck KGaA
ad 1000 ml Aqua dest. auffüllen, auf pH 7,4 einstellen		

Tab. 3.1: *Herstellung des HEPES-Ringer-Puffers*

3.1.3 Vorbereitung zur Messung

Das Delta T Kulturschälchen wurde mit 1,5 ml auf 30°C vorgewärmten HEPES-Ringer Puffer gefüllt und unter dem Mikroskop (Olympus BX 51WI; Olympus GmbH, Hamburg, Deutschland) eingespannt. In den erwärmten HEPES-Ringer-Puffer wurde das 20er Wasser-immersionsobjektiv (UMPlanFl 20x/0.50W; Olympus GmbH) eingetaucht. Durch das Eintauchen wurde ein Absinken der Temperatur zu Beginn der Messungen vermieden. Die Temperatur wurde durch ein integriertes Heizsystem (Bioprotechs) während des gesamten Versuchs konstant auf 30°C gehalten. Dies konnte durch einen in das Schälchen eingetauchten Temperaturfühler kontrolliert werden.

Eine oberhalb des Okulars an das optische System angeschlossene Kamera (SMX-150M; Sumix Corporation, Oceanside, USA) machte zu entsprechend des Protokolls

festgelegten Zeitpunkten (s. unten) Aufnahmen und speicherte sie auf dem angeschlossenen Computer ab.

Vor Beginn der Aufnahmen wurde die Imagingsoftware Stream Pix (Norix Inc., Montreal, Canada) am Computer auf folgende Werte eingestellt:

Bildgröße: x: 640 y: 512

Aufnahmefrequenz: 12 Hz

Aufnahmen insgesamt: 200 (1 Aufnahme pro 84 ms)

3.1.4 Messung

Seitlich der Trachea wurden 2,3 μ l Dynabeads (Invitrogen Dynal AS, Oslo, Norwegen) mit einem Durchmesser von 2,8 μ m hinzupipettiert und die Lösung mit Hilfe einer Pipette durchmischt. Für die Aufnahme der Dynabeads wurde eine Stelle zwischen den Knorpelspannen fokussiert, die möglichst in der Mitte der Trachea lag und von Blutgefäßen frei war. Die gewählte Fokusebene lag möglichst dicht bei den Zilien. Um zu verhindern, dass sich die Dynabeads am Boden des Sylgardgels ablagern, wurde 30 s vor jeder Messung der HEPES-Ringer-Puffer mittels einer Pipette zweimal durchmischt.

Für alle Versuchsprotokolle galt:

- Messpunkt 0 = 30 min nach Tod des Tieres
- Zugabe von Nikotin (10^{-4} M; Sigma Aldrich GmbH) erfolgte nach 61 min
- Zugabe von ATP (10^{-4} M; Sigma Aldrich GmbH) erfolgte nach 75 min
- letzte Messung war 85 min nach Tod des Tieres
- Zeitangabe ist in Minuten gegeben
- Jede Zeitangabe steht für einen Messpunkt

Zur Abklärung der Beteiligung einzelner nikotinischer Rezeptoren an der PTG wurden Antagonisten verschiedener Untereinheiten (Tab. 3.2) des nAChR zugegeben und im Anschluss die Nikotinwirkung untersucht. Die abschließende Zugabe von ATP, einem Stimulans der Zilienschlagfrequenz und somit auch der PTG, diente der Vitalitätsüberprüfung der Trachea.

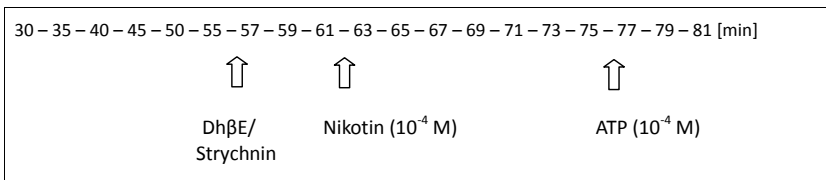
Antagonist	betroffene nAChR - Untereinheit	eingesetzte Konzentration	Quelle
α -Bungarotoxin (α -BTX)	$\alpha 7, \alpha 9$	10^{-7} M, 10^{-5} M	Sigma-Aldrich GmbH; Steinheim, Deutschland
Dihydro- β -erythroidin (Dh β E)	$\alpha 4\beta 2, \alpha 3\beta 2, \alpha 3\beta 4$	10^{-5} M	Tocris Bioscience; Ellisville, USA
Strychnin	$\alpha 9\alpha 10$	10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M	Tocris Bioscience; Ellisville, USA

Tab. 3.2: Eingesetzte Antagonisten der nAChR-Untereinheiten

Alle Antagonisten wurden vor Versuchsbeginn mit HEPES-Ringer-Puffer (Tab. 3.1) aliquotiert und bei -20°C im Gefrierschrank gelagert.

Dh β E und Strychnin

Die Zugabe von Dh β E und Strychnin erfolgte nach abgeschlossener Aufnahme bei Minute 55 (Abb. 3.1).

Abb. 3.1: Versuchsprotokoll bei Dh β E- bzw. Strychnin-Zugabe

α -BTX

Die Zugabe von α -BTX erfolgte nach abgeschlossener Aufnahme bei Minute 35 (Abb. 3.2).

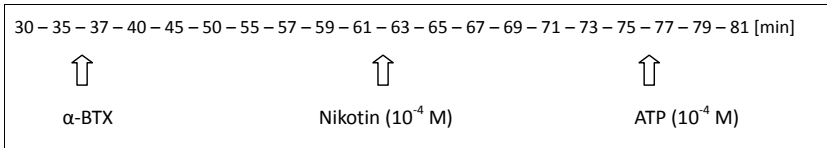


Abb. 3.2: *Versuchsprotokoll bei α -BTX-Zugabe*

Kontrollversuche

Bei den Versuchen zur Kontrolle der Steigerung der PTG durch Nikotin wurden keine Antagonisten eingesetzt. Statt der Antagonisten wurde ein entsprechendes Volumen HEPES-Ringer-Puffer hinzugegeben, um eine mögliche Stimulierung der Trachea lediglich durch eine Volumenzunahme oder die wegen des Pipettierungsschritts entstehenden Turbulenzen ausschließen zu können.

Die zusätzliche Messung nach Antagonistenzugabe in den Versuchen mit α -BTX in Minute 37 wurde ebenfalls in den Kontrollversuchen durchgeführt. Damit sollte ausgeschlossen werden, dass das zusätzliche Durchmischen mit der Pipette zu den o.g. Zeitpunkten Auswirkungen auf den Partikeltransport hat (Abb. 3.3).

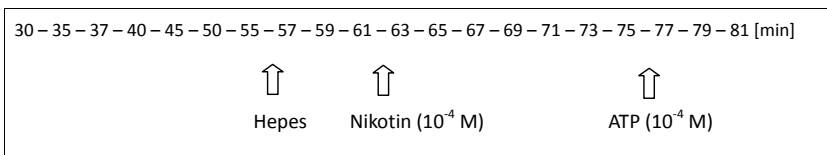


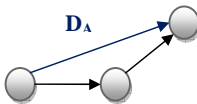
Abb. 3.3: *Versuchsprotokoll bei den Kontrollversuchen*

3.1.5 Auswertung

Zur Auswertung der Aufnahmen wurde die Software Image-Pro Analyzer 6.2 (Media Cybernetics, Silver Spring, USA) verwendet. Zu Beginn musste jeder Film von einer 12 gray Skala (Original) in eine 8 gray Skala (Kopie) umgewandelt werden. Danach wurde eine Hintergrundkorrektur der Kopie durchgeführt, um ein binäres Bild zu erhalten, in dem der Hintergrund schwarz und die sichtbaren Partikel weiß erscheinen. Durch die zurückgelegte Distanz (d) konnte die Software die Geschwindigkeit ($v = d / t_2 - t_1$; (t = Zeit)) der einzelnen Partikel bestimmen. Bei der Distanz wurde unterschieden zwischen idealer (= direkter Distanz vom Startpunkt zum Endpunkt) und akkumulierter Distanz (= Summe der Distanzen vom Startpunkt aus). Aus diesen 3 Größen (Geschwindigkeit v , idealer Distanz D_A und akkumulierter Distanz D_B (Abb. 3.4)) berechnete die Software:

- 1) MW = Mittelwert der Durchschnittsgeschwindigkeit aller Partikel
- 2) MD = Median der Durchschnittsgeschwindigkeit aller Partikel
- 3) MW 1.15 = Mittelwert der Durchschnittsgeschwindigkeit aller Partikel, deren zurückgelegter Weg nicht mehr als 15 % von der idealen Distanz abweicht.
- 4) MD 1.15 = Median der Durchschnittsgeschwindigkeit aller Partikel, deren zurückgelegter Weg nicht mehr als 15 % von der idealen Distanz abweicht.

a) Ideale Distanz



b) Akkumulierte Distanz

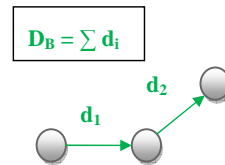


Abb. 3.4: Graphische Darstellung der idealen und der akkumulierten Distanz (D_A und D_B), die zusammen mit der Geschwindigkeit v (s.o.) zur Berechnung der PTG benötigt werden.

Zur Berechnung der Werte wurden nur Partikel berücksichtigt, die in mindestens 10 aufeinander folgenden Bildern sichtbar waren.

Mittels 3) und 4) wurden Partikel, die mehr als 15 % von der idealen Distanz abweichen, ausgeschlossen. Dies ermöglichte einen Ausschluss von sich im Kreis drehenden oder liegen gebliebenen Partikeln (Abb. 3.5).

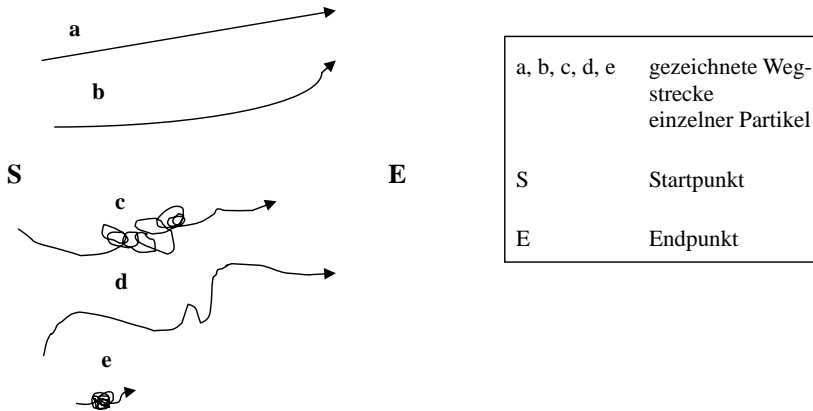


Abb. 3.5: Graphische Darstellung möglicher Wegstrecken verschiedener Partikel, die als Auswertkriterium genutzt werden. Partikel a und b werden in die Auswertung einbezogen; Partikel c, d und e weichen mehr als 15 % vom idealen Weg (= direkter Distanz vom Startpunkt zum Endpunkt) ab und werden daher beim MW 1.15 und MD 1.15 von der Auswertung ausgeschlossen.

Die grafische Darstellung erfolgte mittels Excel-Diagramm, bei dem die Durchschnittsgeschwindigkeiten 1) und 3) der Partikel in $\mu\text{m/s}$ auf die x-Achse (Abszissenachse) gegen die Zeit nach Tod des Tieres in min auf die y-Achse (Ordinatenachse) aufgetragen wurden. Da die Durchschnittsgeschwindigkeit von der Software in einer Programmspezifischen Einheit angegeben wurde, musste sie zuvor mit einem für das Objektiv kalkulierten Faktor multipliziert werden, um in $\mu\text{m/s}$ angegeben werden zu können. Dieser entsprach für das verwendete 20er Objektiv 0,0073885.

Im Ergebnisteil dieser Arbeit wird bei der grafischen Darstellung der PTG einzelner Versuche der MW und der MW 1.15 abgebildet; bei der grafischen Darstellung der Mittelwerte der PTG einer kompletten Versuchsreihe werden zur besseren Übersicht ausschließlich der MW und der Standardfehler (SEM) abgebildet.

3.1.6 Statistik

Zur statistischen Datenanalyse wurde die Software SPSS 17.0 (SPSS Inc. Headquarters Chicago Illinois, USA) verwendet. Zu Beginn wurde mittels Kolmogrow-Smirnow-Test überprüft, ob bei den Nikotin-induzierten Anstiegen der PTG eine Normalverteilung vorliegt. Nachdem dies bestätigt werden konnte, wurden die Ergebnisse einer explorativen Datenanalyse unterzogen. Für verbundene Stichproben wurde der t-Test durchgeführt. Für unverbundene Paare zwischen verschiedenen Versuchsreihen wurde in den Gruppen mit Anstieg nach Nikotingabe die Differenz der Werte vor und nach Nikotingabe gebildet und eine Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Für den Vergleich der Anstiege zwischen bestimmten Versuchsgruppen wurde der t-Test mit Bonferroni-Korrektur angewendet. Die Ergebnisse wurden bei $p \leq 0,05$ als signifikant und bei $p \leq 0,01$ als hochsignifikant eingestuft. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte als Boxplots mit den Minimum-, Maximum- und Medianwerten, sowie den Perzentilen 25 und 75.

3.2 Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

3.2.1 RNA-Isolierung

Für die Untersuchung der mRNA auf Untereinheiten der nAChR im Trachealepithel wurden im Anschluss an die Partikeltransportmessung Trachealepithelzellen mittels eines zuvor sterilisierten Wattestäbchen von der Trachea abgeschabt und in ein mit 350 µl Lysis-Puffer (Zugabe von 1% β-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich GmbH) zu Puffer RLT (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland)) gefülltes Reaktionsgefäß überführt. Da β-Mercaptoethanol RNasen denaturiert und so den Abbau der RNA verhindert, konnten auf diese Weise behandelte Proben bei -80°C gelagert werden.

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus den Trachealepithelzellen wurde mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) nach Anweisung des Herstellers durchgeführt: Zur Homogenisierung wurde die aufgetaute Probe auf eine QIA shredder spin Säule (Qiagen) gegeben und zwei Minuten bei 18.659 g in einer Standard-Mikrozentrifuge (Heraeus Zentrifuge, Thermo Scientific, Deutschland) zentrifugiert. Dem Durchfluss wurden 300 µl 70% Ethanol (Merck KgaA) zugesetzt, und nach Durchmischung wurde die gesamte Flüssigkeit auf eine RNeasy mini spin Säule (Qiagen) pipettiert. In dem nachfolgenden Schritt wurde die RNA an die Membran der RNeasy mini Säule gebunden und anschließend mit 700 µl RW1 Puffer (15 s, 9520 g; Qiagen) und zweimal mit je 500 µl RPE Puffer (Qiagen; zuvor angesetzt mit 4-fachem Volumen Ethanol; 15 s bzw. 2 min, 9520 g) gewaschen. Der Durchfluss wurde nach jedem Schritt verworfen. Zur Trocknung der Membran wurde 1 min bei 18.659 g zentrifugiert. Danach wurden 30 µl RNase-freies Wasser (Ampuwa, Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg, Deutschland) direkt auf die Membran gegeben und im Anschluss wurde die RNA durch Zentrifugation für eine Minute bei 9520 g eluiert.

3.2.2 cDNA-Synthese

Der DNAase-Verdau und das Umschreiben der RNA in cDNA wurden mit dem QuantiTect Reverse Transcription Kit der Firma Qiagen durchgeführt. Zu Beginn wurden 2 µl der isolierten Gesamt-RNA mit 4 µl gDNA Wipeout Puffer für 2 min bei 42° im Thermocycler (Mastercycler Personal, Eppendorf, Wesseling, Deutschland) inkubiert, um die vorhandene genomische DNA mittels DNAase-Verdau zu zerstören.

Zum Umschreiben der RNA in cDNA wurden diesem Ansatz 6 μl eines zuvor hergestellten MasterMix, bestehend aus 1 μl Reverse Transkriptase (RT), 4 μl RT Puffer (enthält Mg^{2+} und dNTPs) und 1 μl RT Primer Mix (alle Substanzen von Qiagen), zugesetzt und für 30 min bei 42°C inkubiert. Zur Inaktivierung der RT wurden die Proben für 3 min auf 95°C erhitzt und bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert.

3.2.3 Durchführung der PCR

Template für die PCR war die zuvor synthetisierte cDNA. Zur Amplifikation bekannter DNA-Abschnitte wurden 2 μl cDNA und 23 μl Reaktions-Mix (s. Tab. 3.3) verwendet. Alle Reagenzien, ausschließlich der Primer, wurden von Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

RNase freies Wasser	17,175 μl
10x PCR-Puffer II (100 mM Tris HCl, 500 mM KCl, pH 8,3)	2,5 μl
MgCl_2 (15 mM)	2 μl
dNTPs (10 mM je dNTP)	0,6 μl
Primer-Mix (Forward + Reverse)	0,6 μl
AmpliQ Gold Polymerase (5 U/ μl)	0,125 μl

Tab. 3.3: *Reaktionsmix für die PCR*

Bei den eingesetzten Primern handelte es sich um intronspannende Forward- und Reverseprimerpaare (Primer-Endkonzentration 20 μM ; Tab. 3.4), die als Startpunkt für die Replikation dienen.

Die Amplifikation wurde mit folgendem Laufprogramm im Thermocycler (Mastercycler Gradient, Eppendorf) durchgeführt: Zuerst wurde der DNA-Doppelstrang durch Erhitzen auf 95°C für 12 min geschmolzen und das Enzym AmpliQ Gold Polymerase aktiviert. Dann wurden 40 Zyklen folgenden Verlaufs durchgeführt: Denaturierung der DNA-Doppelstränge durch Erhitzung für 20 s auf 95°C; Hybridisierung der Primer an die einzelnen DNA-Stränge bei einer Annealing-Temperatur von 60°C für 20 s; Synthese neuer Fragmente durch die Taq-Polymerasen bei 72°C für 20 s. Nach Beendigung der

Zyklus wurde für 7 min die Temperatur auf 73°C gehalten, um die noch nicht abgeschlossene Replikation von DNA-Fragmenten zu vervollständigen. Anschließend erfolgte eine Abkühlung des Reaktionsprodukts auf 4°C.

nAChR- Unter- einheit	Primerpaar	Pro- dukt- größe (bp)	Position der ampli- fizierten DNA- fragmente (bp)	Intron- größe (bp)	Genbank accession number
$\alpha 2$	Forward: ctccastcctgctttccag Reverse: gtttgaacagcggtcctc	115	125-270	1068	NM_1448 03
$\alpha 3$	Forward: cgctgttccagtactgtt Reverse: cagagggtttccatttcagc	196	158-353	2 Introns: 98 & 1858	NM_1451 29
$\alpha 4$	Forward: ctccagatgtggtccttctcc Reverse: ggtgggtgactgcaaagttc	238	182-420	3 Introns: 76 & 3264 & 4348	NM_0157 30
$\alpha 5$	Forward: ccagctaataaccaccaacg Reverse: gctgcgtccaagtgcagct	218	165-382	2 Introns: 1900 & 1826	NM_1768 44
$\alpha 6$	Forward: cctgcactgcggtttatgtc Reverse: cagccacagattggtctcca	231	269-500	2 Introns: 1756 & 2345	NM_0213 69
$\alpha 7$	Forward: acaatacttcgccagcacca Reverse: aaaccatgcacaccagttca	144	922-106	1055	NM_0073 90
$\alpha 9$	Forward: caatgctctgcgtccagtag Reverse: acaccagatcgtgggaa	208	447-655	1186	NM_0010 81104
$\alpha 10$	Forward: tctgctcctgctctttctcc Reverse: ccacaggtacaaggtcagca	207	264-471	1127	NM_0010 81424
$\beta 2$	Forward: gagtgtgaggagagatgga Reverse: tcgtggcagtgtagttctgg	106	1511-1644	3397	NM_0096 02.3
$\beta 3$	Forward: cgatggaacggagagtaa Reverse: agaggagatcggctcaaga	217	1237-1454	21593397	NM_0274 54.2
$\beta 4$	Forward: tctctgttcgctctgcttca Reverse: tgctggtggtcatgatctgt	205	77-281	2 Introns: 4813 & 7338	NM_1489 44

Tab. 3.4: *Verwendete Primer*

3.2.4 Auswertung durch DNA-Gelelektrophorese

Die Auswertung der RT-PCR erfolgte mittels DNA-Gelelektrophorese. Dazu wurden die Amplifikate mit 5 μ l Ladepuffer (0,1 g Orange-G, 5,88 ml 87 % Glycerol, 250 μ l 50 mM TRIS-HCl-Puffer (pH 8,0) und 1 ml EDTA-Lösung (pH 8,0); alle Substanzen von Sigma Aldrich) versetzt und zur elektrophoretischen Auftrennung auf ein 2 % TRIS-Azetat-EDTA-Agarosegel (s. Tab. 3.5) mit Zusatz von 8 μ l/l Ethidiumbromid (1 %; Roth GmbH) gegeben. Zur elektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte und eines mitgeführten DNA-Markers (10 μ l 100 bp DNA Ladder, Invitrogen) wurde an der Kammer für 30 min eine elektrische Spannung von 150 V angelegt. Durch den Farbstoff Ethidiumbromid konnten die entstandenen DNA-Banden unter UV-Licht detektiert und fotografisch aufgenommen werden. Die Größe der DNA-Banden konnte durch Vergleich mit dem standardisierten DNA-Marker bestimmt werden.

20 g/l	Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
242 g/l	TRIS	Carl Roth GmbH & Co
57,1 ml/l	Eisessig	Merck KGaA
100 ml/l	0,5 M EDTA (pH 8,0)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
ad 1000 ml Aqua dest. auffüllen		

Tab. 3.5: Herstellung eines 2 % TRIS-Azetat-EDTA-Agarosegels

3.2.5 Kontrollreaktionen

Als Positivkontrolle für den Erfolg der RNA-Isolierung und der cDNA-Synthese wurden Reaktionen mit einem Primerpaar für das in kernhaltigen Zellen ubiquitär vorkommende Polypeptid β -2-Mikroglobulin verwendet. Als Negativkontrolle für eine Verunreinigung des eingesetzten Primermixes und infolgedessen der Proben mit genomischer DNA wurden PCR-Reaktionen mit RNase freiem Wasser statt cDNA durchgeführt.

Da intronspannende Primerpaare verwendet wurden, konnten die neu synthetisierten DNA-Fragmente von eventuell nach dem DNAase-Verdau noch vorhandener genomischer DNA eindeutig differenziert werden.

3.3 Immunhistochemie

3.3.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden je zwei C57/Bl6-Mäuse sowie zwei α 3-BAC-transgene eGFP-Mäuse beiderlei Geschlechts im Alter von 7-10 Wochen aus der Zucht des Physiologischen Instituts der Justus-Liebig-Universität (SB) verwendet. Des Weiteren wurde zur Kontrolle der Spezifität der Markierung eine α 10-defiziente Maus eingesetzt. Alle Versuchstiere wurden durch Inhalation einer Überdosis Isofluran (Baxter GmbH) getötet.

3.3.2 Perfusionsfixierung

Der Thorax wurde eröffnet, so dass das Herz freilag. Nach intracardialer Injektion von 0,5 ml Heparin wurde der rechte Vorhof eröffnet und im linken Ventrikel wurde eine Kanüle bis zur Aorta descendens vorgeschoben und mit einer Klemme fixiert. Über die Kanüle wurde das Blut mit einer Vorspüllösung (Tab. 3.6) aus dem Kreislauf gewaschen und im Anschluss das Tier mit dem Fixans Zamboni (Tab. 3.6) perfundiert. Nach der Perfusion wurden die Mäuse für ca. 1 h bei 4°C im Kühlschrank gelagert und danach mit der Gewebeentnahme begonnen. Das entnommene Gewebe wurde 3 Tage unter mehrfachem Austausch mit 0,1 M Phosphatpuffer (PP) gewaschen und im Anschluss für 12 h mit 18 % saccharosehaltigem Phosphatpuffer inkubiert, um eine Kryoprotektion zu erreichen. Danach wurden die Proben in flüssigem Stickstoff schockgefroren und konnten dann bei -80°C gelagert werden.

Vorspüllösung	2,5 % Polyvinylpyrrolidon (Roth) 0,9 % NaCl (Merck) 0,5 % Procainhydrochlorid (Merck) pH 7,4
Fixans Zamboni	2 % Formaldehyd in 0,1 M PP (s.u.) + 15 % Pikrinsäure
0,1 M Phosphatpuffer (PP)	15,6 g/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (Merck) 17,8 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (Fluka Biochemika, Steinheim, Deutschland) pH 7,4
PBS	28,75 ml Lösung A (31,2 g/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck) + 96,20 ml Lösung B (17,8 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (Fluka Biochemika) 22,4 g NaCl ad 5 l Aqua dest. auffüllen, auf pH 7,4 einstellen

Tab. 3.6: Zusammensetzung der zur Perfusionsfixierung benötigten Lösungen

3.3.3 Indirekte Immunfluoreszenz an der Trachea

Von den zu untersuchenden Tracheen wurden Gewebeschnitte von 10 μm Dicke angefertigt (Microm HM 560, MICROM International GmbH, Walldorf, Deutschland) und auf SuperFrost Plus Objektträger (Menzel Gläser, Braunschweig, Deutschland) aufgezogen. Danach wurden die Schnitte für 1 h bei Raumtemperatur getrocknet. Zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen wurden die Schnitte 1 h mit 10 % normalem Pferdeserum (NHS; hitzeinaktiviert und sterilfiltriert, Schlachthof Marburg) mit einem Zusatz von 0,5 % Tween 20 in PBS behandelt. Die Primärantikörper wurden in PBS mit einem Zusatz von 22,4 g/5l NaCl (PBS+S) in der erforderlichen Verdünnung angesetzt (Tab. 3.7) und auf den Schnitten über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 3x je 10 min Waschen mit PBS erfolgte für 1 h die Zugabe der zuvor in PBS+S in der Gebrauchsverdünnung angesetzten Sekundärantikörper (Tab. 3.8). Nach erneut 3 x je 10 min Waschen mit PBS wurden die Schnitte zur Fixation der Bindung zwischen Primär- und Sekundärantikörper mit 4 % PFA für 10 min nachfixiert, abermals zweimalig mit PBS gewaschen und mit Bicarbonat-gepuffertem Glycerol (pH 8,6) eingedeckelt. Die Objektträger wurden bis zur Auswertung bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Die Immunreaktion wurde mittels eines Fluoreszenzmikroskops (Axioplan 2 Imaging, Zeiss, Jena) ausgewertet und dokumentiert.

Antigen	Wirtsspezies	Verdünnung	Quelle
α 10-Untereinheit (AS 404-417)	Meerschweinchen (Tier 1, 90. IT), polyklonal	1:2000	Lips et al. 2002
α 10-Untereinheit (AS 404-417)	Kaninchen (Tier 1, 61. IT), polyklonal	1:2000	Lips et al. 2002
α 10-Untereinheit (AS 404-417)	Kaninchen (Tier 2, 80. IT), polyklonal	1:2000	Lips et al. 2002

Tab. 3.7: Primärantikörper zur Untersuchung der α 10-Untereinheit des nAChRs im Trachealepithel. IT = Immunisierungstag.

Antigen	Wirtsspezies	Konjugat	Verdünnung	Quelle
Kaninchen-IgG	Esel	Cy-3	1:1000	Chemicon, Temecula, USA
Meerschweinchen-IgG	Esel	Cy-3	1:800	Dianova, Hamburg, Deutschland

Tab. 3.8: Sekundärantikörper

3.3.4 Kontrollreaktionen zu den indirekten Immunfluoreszenzuntersuchungen

Negativkontrollen

Zur Kontrolle der Spezifität der Markierung wurden Kryoschnitte von α 10-defizienten Mäusen mit den anti- α 10-Antikörpern inkubiert.

Zur Bestimmung der Spezifität der Markierung der sekundären Antikörper wurden immer Präparate mitgeführt, auf denen der Primärantikörper ausgelassen wurde. Nur wenn diese Kontrolle keine Immunmarkierung aufwies, wurden die Objektträger ausgewertet.

4 Ergebnisse

4.1 Messung der PTG in der Trachea von Bl6-Mäusen

4.1.1 PTG nach Zugabe von Nikotin und ATP

Um eine Beteiligung der nAChR an der PTG in der Trachea zu testen, wurde zunächst die Reaktion auf Nikotin, dem klassischen Agonisten des nAChR, getestet. Bei diesen Versuchen (Abb. 4.1) kam es nach einem Startwert von $80,9 \pm 6,1 \mu\text{m/s}$ in Minute 30 bis zum Zeitpunkt der Nikotinzugabe in Minute 61 zu einem signifikanten Abfall der PTG auf $38,5 \pm 3,5 \mu\text{m/s}$ ($p \leq 0,001$).

Da in nachfolgenden PTG-Versuchen in Minute 55 Antagonisten des nAChR hinzugegeben wurden, die zuvor in Hepes gelöst wurden, wurde hier in Minute 55 Hepes zugegeben. Dies diente der Kontrolle, ob durch Hepeszugabe die PTG beeinflusst wird. Es wurde jedoch in keinem der durchgeführten Versuche eine Steigerung der PTG durch Hepes beobachtet (Abb. 4.2). Nach Zugabe von Nikotin in einer Konzentration von 10^{-4} M in Minute 61 konnte in der nachfolgenden Messung (Minute 63) eine signifikante Erhöhung der PTG von $38,5 \pm 3,5 \mu\text{m/s}$ auf $99,1 \pm 10,0 \mu\text{m/s}$ ($p \leq 0,001$) festgestellt werden. Danach kam es erneut zu einem signifikanten Abfall der PTG ($p \leq 0,001$). Maximale Stimulation der PTG erfolgte durch die Gabe von ATP in einer Konzentration von 10^{-4} M am Ende jeden Versuchs. Der Anstieg der PTG von $51,5 \pm 3,1 \mu\text{m/s}$ auf $113,4 \pm 8,1 \mu\text{m/s}$ nach Zugabe von ATP in Minute 75 war ebenfalls hochsignifikant ($p \leq 0,001$), womit auch die Vitalität des Epithels am Ende jedes Versuches belegt wurde.

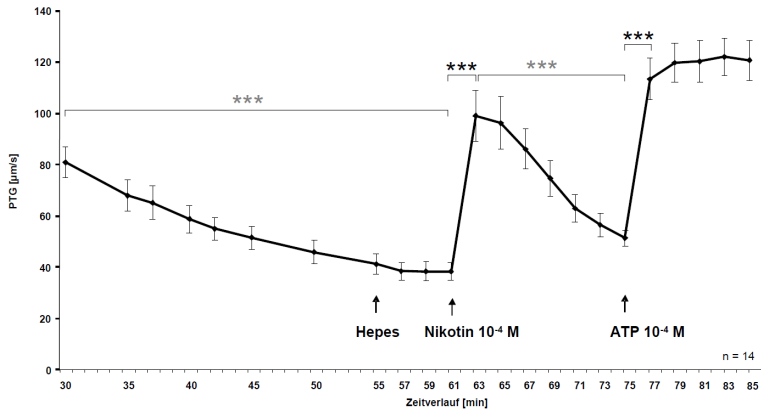


Abb. 4.1: *PTG nach Zugabe von HEPES, Nikotin und ATP.* Dargestellt sind der MW in $\mu\text{m/s}$ und der SEM. *** $p \leq 0,001$, t-Test ($n = 14$)

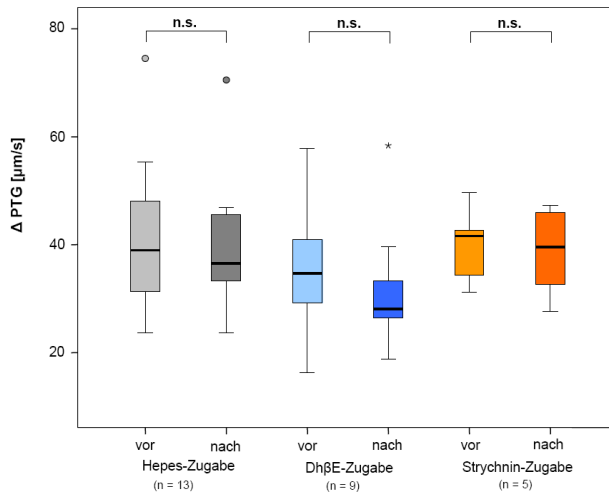


Abb. 4.2: *Die Boxplots illustrieren die Partikeltransportgeschwindigkeiten vor und 2 min nach Zugabe von HEPES, DhβE und Strychnin (Minute 55 und Minute 57).* Die Zugabe der Substanzen bewirkt keine Veränderung der PTG nicht signifikant (n.s.): $p > 0,05$. \circ = Datenpunkt außerhalb der dreifachen Standardabweichung. * = extremer Ausreißer. Boxplots: Minimum (unterer Strich/"Whisker"), Maximum oberer Strich/"Whisker" und Medianwerte (Strich in der Box) sowie die Perzentile 25 (unteres Ende der Box) und 75 (oberes Ende der Box).

4.1.2 PTG nach Zugabe von Mecamylamin, Nikotin und ATP

In einer vorangegangenen Promotionsarbeit (kommuniziert von I. Boseva, Giessen) zeichnete sich ab, dass nach Zugabe von Mecamylamin, einem unselektiven nAChR-Antagonisten, keine Stimulation der PTG durch Nikotin erreicht werden konnte. Dies wurde im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit zuerst bestätigt (Abb. 4.3). Zur Aufklärung der Rezeptoruntereinheiten, die einen Einfluss auf den Partikeltransport haben, wurden in nachfolgenden PTG-Versuchen partielle Antagonisten verschiedener Untereinheiten des nAChR eingesetzt.

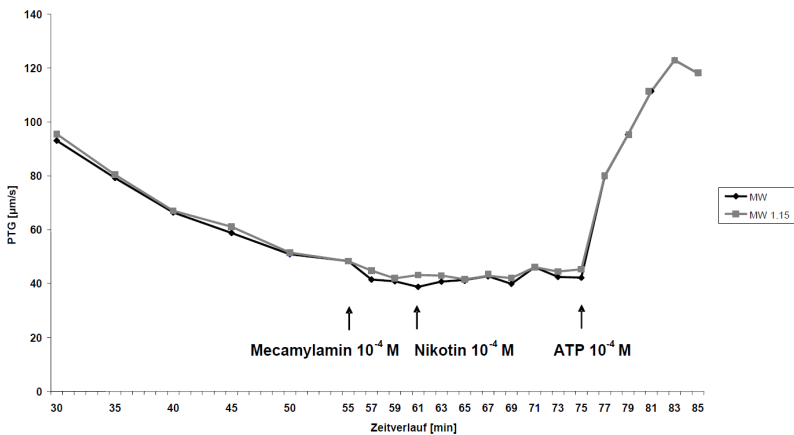


Abb. 4.3: PTG nach Zugabe von Mecamylamin, Nikotin und ATP. Nach der Gabe von Mecamylamin ist keine Stimulation der PTG durch Nikotin mehr möglich. Dargestellt sind die Mittelwerte der PTG aller Partikel eines Versuchs (schwarze Kurve) und die Mittelwerte der PTG von Partikeln deren zurückgelegter Weg zwischen Start- und Endpunkt nicht mehr als 15 % vom idealen Weg abweicht (graue Kurve).

4.1.3 Expression der Untereinheiten des nAChR

Um die Zusammensetzung der Untereinheiten des nAChR im Trachealepithel aufzudecken, wurde die Expression von nAChR-Untereinheiten mittels RT-PCR untersucht. Dazu wurde im Anschluss an die PTG-Versuche mit Nikotin das Epithel abgeschabt ($n = 9$, C57/Bl6-Mäuse) und in RT-PCR-Untersuchungen eingesetzt. Desweiteren wurde das Trachealepithel von Mäusen mit Gendefizienz für die $\alpha 7$ -Untereinheit des nAChR ($\alpha 7$ -KO; $n = 3$) und von Mäusen des korrespondierenden Wildtyps ($\alpha 7$ -WT; $n = 2$) untersucht.

In C57/Bl6-Mäusen stellte sich das Expressionsprofil der nAChR-Untereinheiten wie folgt dar (Tab. 4.1): mRNA für die $\alpha 2$ - und die $\alpha 4$ -Untereinheit wurde jeweils in 1 von 9 Tieren (11 %) nachgewiesen. In 6 von 8 Tieren (75 %) wurde mRNA für die $\alpha 3$ -Untereinheit nachgewiesen. In 4 von 8 Tieren (50 %) wurde mRNA für die $\alpha 5$ -Untereinheit nachgewiesen. In keinem der untersuchten Tiere konnte mRNA für die $\alpha 6$ - oder die $\beta 3$ -Untereinheit nachgewiesen werden. Messenger RNA für die $\alpha 7$ -, $\alpha 10$ - und $\beta 2$ -Untereinheit wurde in allen 9 untersuchten Tieren nachgewiesen. In 2 von 8 Tieren (25 %) wurde mRNA für die $\alpha 9$ -Untereinheit nachgewiesen und 5 von 7 (71 %) untersuchten Tieren wiesen mRNA für die $\beta 4$ -Untereinheit auf. Alle amplifizierte Gensequenzen wurden als einzelne Bande in der erwarteten Produktgröße detektiert (s. Gelbild, Abb. 4.4).

In den $\alpha 7$ -KO Mäusen wurde dem Genotyp entsprechend keine mRNA für die $\alpha 7$ -Untereinheit detektiert; in beiden Mäusen des korrespondierenden WT-Stammes wurde mRNA für die $\alpha 7$ -Untereinheit nachgewiesen (Tab. 4.2). In 2 von 3 $\alpha 7$ -KO- und 2 von 2 $\alpha 7$ -WT-Tieren wurde mRNA für die $\alpha 2$ -Untereinheit nachgewiesen. Der Nachweis von mRNA für die $\alpha 3$ -Untereinheit erfolgte in 2 von 3 $\alpha 7$ -KO-Tieren und in keinem der $\alpha 7$ -WT-Tiere. mRNA für die $\alpha 4$ -, $\alpha 5$ - und $\alpha 6$ -Untereinheit wurde weder in den $\alpha 7$ -WT- noch in den $\alpha 7$ -KO-Mäusen nachgewiesen. Messenger RNA für die $\alpha 9$ -Untereinheit wurde in 1 von 2 $\alpha 7$ -WT- und in 2 von 3 $\alpha 7$ -KO-Tieren nachgewiesen. Identisch zu den C57/Bl6-Mäusen wurde in allen untersuchten Tieren mRNA für die $\alpha 10$ - und die $\beta 2$ -Untereinheit nachgewiesen. Keines der Tiere wies mRNA für die $\beta 3$ -Untereinheit auf. Messenger RNA für die $\beta 4$ -Untereinheit wurde in beiden $\alpha 7$ -WT- und in 2 von 3 $\alpha 7$ -KO-Tieren nachgewiesen. Alle PCR-Produkte lagen in der erwarteten Größe vor (Abb. 4.4).

nAChR-Untereinheit Tier Nr. (B16)	$\alpha 2$	$\alpha 3$	$\alpha 4$	$\alpha 5$	$\alpha 6$	$\alpha 7$	$\alpha 9$	$\alpha 10$	$\beta 2$	$\beta 3$	$\beta 4$
1	∅	+	∅	+	∅	+	∅	+	+	∅	
2	∅	+	∅	+	∅	+		+	+	∅	+
3	∅	∅	∅	∅	∅	+	∅	+	+	∅	∅
4	∅	∅	∅	∅	∅	+	∅	+	+	∅	∅
5	∅	+	∅	+	∅	+	+	+	+	∅	+
6	∅		∅		∅	+	∅	+	+	∅	+
7	∅	+	+	∅	∅	+	+	+	+	∅	
8	+	+	∅	∅	∅	+	∅	+	+	∅	+
9	∅	+	∅	+	∅	+	∅	+	+	∅	+

Tab. 4.1: *Expressionsmuster der Untereinheiten des nAChRs im Trachealepithel von 9 C57/B16-Mäusen.*
 +: Expression der Untereinheit. ∅: keine Expression der Untereinheit. Schwarze Felder: Trachealepithel wurde nicht auf die entsprechende nAChR-Untereinheit untersucht.

nAChR-Untereinheit Tier Nr. ($\alpha 7$ -WT)	$\alpha 2$	$\alpha 3$	$\alpha 4$	$\alpha 5$	$\alpha 6$	$\alpha 7$	$\alpha 9$	$\alpha 10$	$\beta 2$	$\beta 3$	$\beta 4$
1	+	∅	∅	∅	∅	+	+	+	+	∅	+
2	+	∅	∅	∅	∅	+	∅	+	+	∅	+
Tier Nr. ($\alpha 7$ -KO)											
1	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	+	+	∅	∅
2	+	+	∅	∅	∅	∅	+	+	+	∅	+
3	+	+	∅	∅	∅	∅	+	+	+	∅	+

Tab. 4.2: *Expressionsmuster der Untereinheiten des nAChR im Trachealepithel von 2 $\alpha 7$ -WT-Mäusen und 3 $\alpha 7$ -KO Mäusen.* +: Expression der Untereinheit. ∅: keine Expression der Untereinheit.

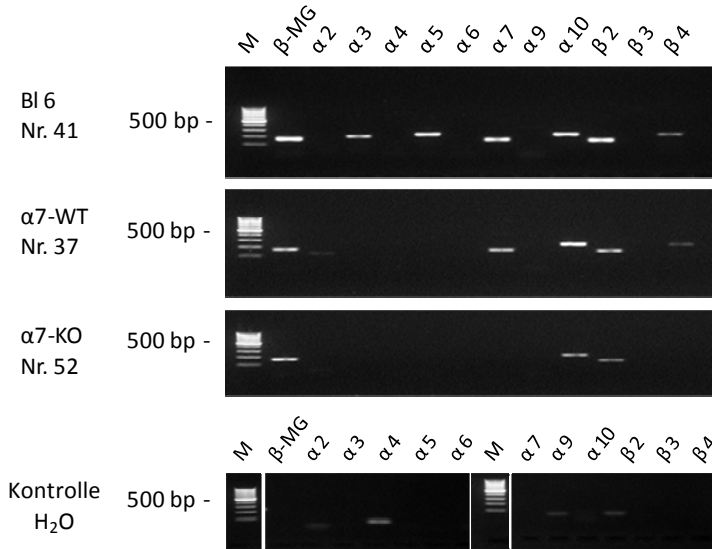


Abb. 4.4: *RT-PCR*. Detektierte Untereinheiten des nAChR im abgeschabten Trachealepithel von je einer C57/Bl6-, einer $\alpha 7$ -WT-, und einer $\alpha 7$ -KO-Maus. Da intronspannende Primer verwendet wurden, erfolgte keine RT-Kontrolle. Niedermolekulare Produkte in der H_2O Kontrolle stellen Primer-Dimere dar. In allen drei Tieren werden die Untereinheiten $\alpha 10$ und $\beta 2$ exprimiert. M = Basenpaarmarker, β -MG = β -Mikroglobulin, eingesetzt als House-keeping-Gen, H_2O = Negativkontrolle ohne cDNA.

4.2 Charakterisierung der an der Regulation der PTG beteiligten Untereinheiten durch Zugabe selektiver nAChR-Antagonisten

Nachdem mittels RT-PCR aufgezeigt wurde, welche nAChR-Untereinheiten im Trachealepithel vorkommen, wurde in nachfolgenden Versuchen getestet, welche dieser Untereinheiten für den beobachteten Effekt der Steigerung der PTG durch Nikotin verantwortlich sind. Dazu wurde die Reaktion auf Nikotin nach Gabe selektiver Antagonisten nAChR-Untereinheiten untersucht.

4.2.1 PTG nach Zugabe von Dh β E, Nikotin und ATP

Dh β E wurde als Antagonist gegen nAChR mit $\alpha 4\beta 2$ -, $\alpha 3\beta 2$ - und $\alpha 3\beta 4$ -Untereinheiten eingesetzt. Nach einem Startwert von $72,9 \pm 6,0 \mu\text{m/s}$ kam es bis zur Nikotिंगabe in Minute 61 zu einem signifikanten Abfall der PTG ($p \leq 0,001$) (Abb. 4.5). Die Zugabe von Dh β E (10^{-5} M) selbst hatte keinen Einfluss auf diesen Abfall (Abb. 4.2, $p = 0,519$). Überdies war die PTG nach Gabe von Dh β E identisch zu der PTG nach Gabe von Hesper in den Kontrollversuchen ($p = 0,848$; Abb. 4.6).

Nach Zugabe von 10^{-4} M Nikotin in Minute 61 wurde nach 2 min eine signifikante Erhöhung der PTG von $32,6 \pm 4,4 \mu\text{m/s}$ auf $78,5 \pm 11,7 \mu\text{m/s}$ ($p = 0,006$) festgestellt. Nach der Stimulation mit Nikotin bis zur Zugabe von ATP in Minute 75 kam es erneut zu einem signifikanten Abfall der PTG ($p = 0,007$). Die Zugabe von 10^{-4} M ATP in Minute 75 bewirkte ebenfalls einen signifikanten Anstieg der PTG von $45,8 \pm 6,4 \mu\text{m/s}$ auf $108,9 \pm 11,1 \mu\text{m/s}$ ($p \leq 0,001$).

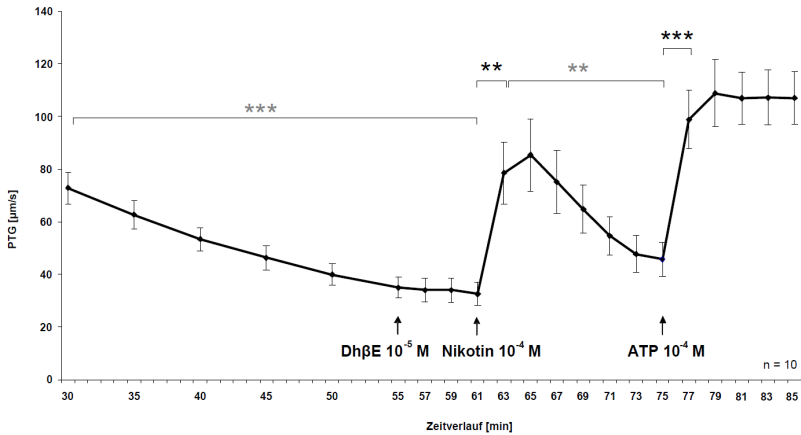


Abb. 4.5: PTG nach Zugabe von DhβE, Nikotin und ATP. Die Nikotingabe bewirkt einen Anstieg der PTG. Dargestellt sind der MW in $\mu\text{m/s}$ und der SEM. $**p \leq 0,01$, $***p \leq 0,001$. t-Test ($n = 10$)

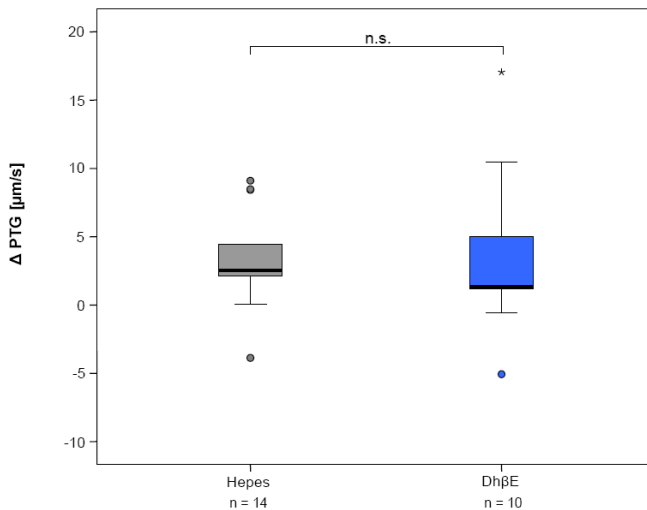


Abb. 4.6: Die Boxplots illustrieren die PTG-Differenz vor und nach Zugabe von Hepes und von DhβE (Minute 55 – Minute 57), es liegt kein Unterschied vor ($p = 0,848$), nicht signifikant (n.s.): $p > 0,05$. $^{\circ}$ = Datenpunkt außerhalb der dreifachen Standardabweichung. * = extremer Ausreißer. Boxplots: Minimum, Maximum und Medianwerte sowie die Perzentile 25 und 75.

4.2.1.1 Expression der nAChR $\alpha 3$ -, $\alpha 4$ -, $\beta 2$ - und $\beta 4$ -Untereinheiten

In drei Tiere wurde nach den PTG-Versuchen mit Nikotin und dem Antagonisten Dh β E das Trachealepithel auf die Expression der o.g. nAChR-Untereinheiten untersucht. Messenger RNA für die $\beta 2$ -Untereinheit wurde in allen drei Tieren (100 %) nachgewiesen. In einem der drei Tieren (33 %) wurde sowohl mRNA der $\alpha 3$ -Untereinheit, als auch der $\beta 4$ -Untereinheit nachgewiesen (Tab. 4.3, Maus Nr. 1). In diesem Tier war keine Hemmung der Nikotinantwort durch die Gabe von Dh β E möglich. In keinem der drei Tiere wurde mRNA für die $\alpha 4$ -Untereinheit nachgewiesen. Dies ließ sich aus dem im Rahmen dieser Arbeit erstellen Expressionsprofil (Tab. 4.1) annehmen. Dort wurde die $\alpha 4$ -Untereinheit weder in den $\alpha 7$ -WT- noch in den $\alpha 7$ -KO-Mäusen und in nur 1 von 9 C57/B16-Mäusen detektiert. Alle amplifizierten Gensequenzen wurden als einzelne Bande in der erwarteten Produktgröße detektiert.

In Maus Nr. 1 wurden Untereinheiten, die sowohl zur Bildung funktionstüchtiger $\alpha 3\beta 2$ - als auch zur Bildung $\alpha 3\beta 4$ -nAChR notwendig sind, nachgewiesen. Da explizit in diesem Tier (Abb. 4.6) keine Hemmung der Stimulation der PTG nach Nikotingabe möglich war, konnte eine Beteiligung dieser Rezeptoren an der Steigerung der PTG ausgeschlossen werden.

Tier Nr. nAChR-Untereinheit	1	2	3
$\alpha 3$	+	Ø	Ø
$\alpha 4$	Ø	Ø	Ø
$\beta 2$	+	+	+
$\beta 4$	+	Ø	Ø

Tab. 4.3: *Expressionsmuster der Untereinheiten des nAChR im Trachealepithel von Mäusen (n = 3), in denen Dh β E keinen Einfluss auf die Nikotin-induzierte Steigerung der PTG hatte. +: Expression der Untereinheit. Ø: keine Expression der Untereinheit.*

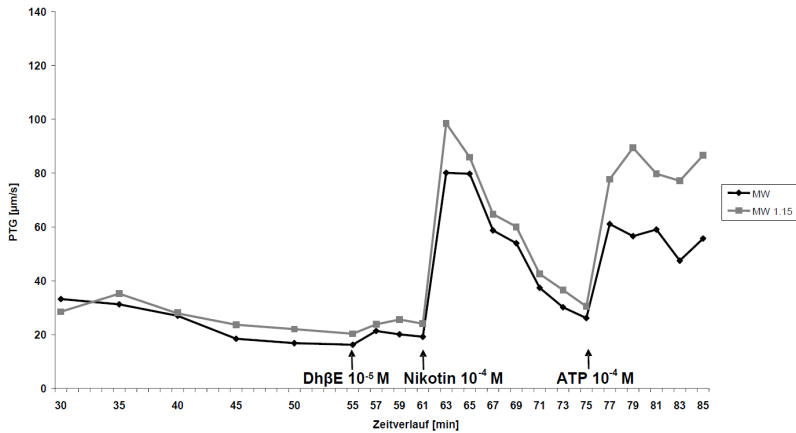


Abb. 4.6: Darstellung der PTG in einem Tier, in dem das Vorkommen der $\alpha 3$ -, $\beta 2$ - und $\beta 4$ -Untereinheit mittels PCR nachgewiesen wurde. Es erfolgt keine Hemmung der Nikotinantwort durch Antagonisierung der $\alpha 3\beta 2$ - oder der $\alpha 3\beta 4$ -Rezeptoren mit Dh β E. Dargestellt sind die Mittelwerte der PTG aller Partikel eines Versuchs (schwarze Kurve) und die Mittelwerte der PTG von Partikeln deren zurückgelegter Weg zwischen Start- und Endpunkt nicht mehr als 15 % vom idealen Weg abweicht (graue Kurve).

4.2.2 PTG nach Zugabe von α -BTX, Nikotin und ATP

Als Antagonist gegen die nAChR-Untereinheiten $\alpha 7$ und $\alpha 9$ wurde α -BTX in einer Konzentration von 10^{-7} M eingesetzt (Abb. 4.7). Nach einem Startwert von $86,1 \pm 8,2$ $\mu\text{m/s}$ in Minute 30 kam es bis zur Nikotiningabe in Minute 61 zu einem signifikanten Abfall der PTG ($p \leq 0,001$). Nach Zugabe von 10^{-4} M Nikotin in Minute 61 konnte 2 min später eine signifikante Erhöhung der PTG von $41,1 \pm 5,1$ $\mu\text{m/s}$ auf $75,6 \pm 10,5$ $\mu\text{m/s}$ ($p = 0,008$) festgestellt werden. Die Zugabe von 10^{-4} M ATP in Minute 75 bewirkte ebenfalls einen signifikanten Anstieg der PTG von $53,0 \pm 6,7$ $\mu\text{m/s}$ auf $105,7 \pm 7,0$ $\mu\text{m/s}$ ($p \leq 0,001$).

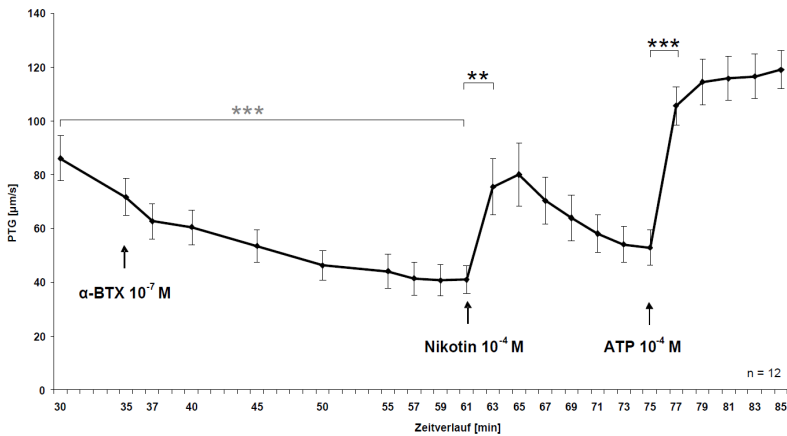


Abb. 4.7: PTG nach Zugabe von α -BTX 10^{-7} M, Nikotin und ATP. Die Nikotiningabe bewirkt einen Anstieg der PTG. Dargestellt sind der MW in $\mu\text{m/s}$ und der SEM. $**p \leq 0,01$, $***p \leq 0,001$. t-Test ($n = 12$)

Auch nach Zugabe von 10^{-5} M α -BTX kam es zu einer signifikanten Nikotin-induzierten Steigerung der PTG von $50,2 \pm 8,2$ $\mu\text{m/s}$ auf $128,6 \pm 2,4$ $\mu\text{m/s}$ ($p = 0,015$). Danach kam es zu einem signifikanten Abfall der PTG ($p = 0,004$). Die Zugabe von ATP in einer Konzentration von 10^{-4} M in Minute 75 bewirkte ebenfalls einen signifikanten Anstieg der PTG von $62,4 \pm 3,2$ $\mu\text{m/s}$ auf $97,5 \pm 3,6$ $\mu\text{m/s}$ ($p = 0,013$; Abb. 4.8).

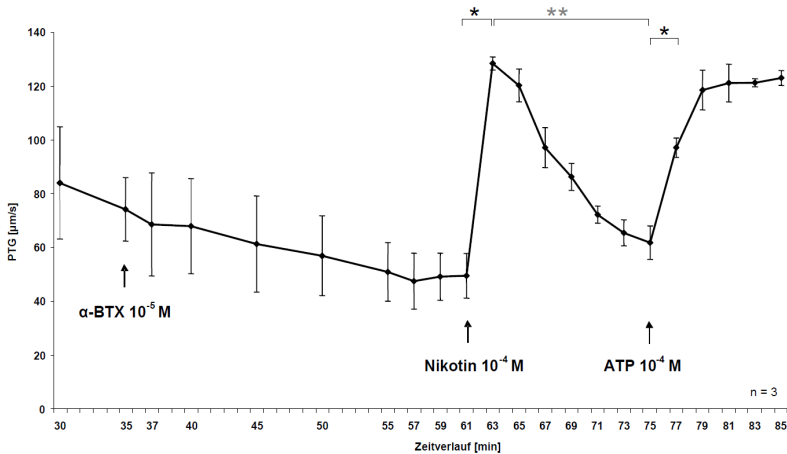


Abb. 4.8: PTG nach Zugabe von α -BTX 10^{-5} M, Nikotin und ATP. Die Nikotiningabe bewirkt einen Anstieg der PTG. Dargestellt sind der MW in $\mu\text{m/s}$ und der SEM. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$. t-Test ($n = 3$)

4.2.2.1 Expression der $\alpha 7$ - und $\alpha 9$ -Untereinheit des nAChR

Nach dem Ermitteln der Nikotin-induzierten PTG nach Zugabe von α -BTX wurde bei 6 Tieren das Trachealepithel abgeschabt und mittels RT-PCR auf das Vorliegen der nAChR-Untereinheiten $\alpha 7$ und $\alpha 9$ untersucht (Tab. 4.4).

Bei 4 von 6 Tieren (67 %) wurde im abgeschabten Trachealepithel mRNA für die $\alpha 7$ -Untereinheit als einzelne Bande in erwarteter Größe von 144 bp nachgewiesen. Bei 1 von 6 Tieren (17 %) wurde neben mRNA für die $\alpha 7$ -Untereinheit ebenfalls mRNA für die $\alpha 9$ -Untereinheit als einzelne Bande in erwarteter Größe von 208 bp nachgewiesen (Maus Nr. 5). Explizit in diesem Tier kam es nicht zu einer Hemmung der Nikotinantwort (Abb. 4.9), was darauf hindeutet, dass diese Rezeptoren nicht an der Regulation des Partikeltransports beteiligt sind.

Tier Nr. nAChR- Untereinheit	1	2	3	4	5	6
$\alpha 7$	+	∅	+	∅	+	∅
$\alpha 9$	∅	∅	∅	∅	+	∅

Tab. 4.4: Expression der nAChR $\alpha 7$ - und der $\alpha 9$ -Untereinheit bei 6 C57/B16 Mäusen, an denen zuvor in PTS-Versuchen α -BTX als Antagonist gegen die o.g. Untereinheiten eingesetzt wurde. +: Expression der Untereinheit. ∅: keine Expression der Untereinheit.

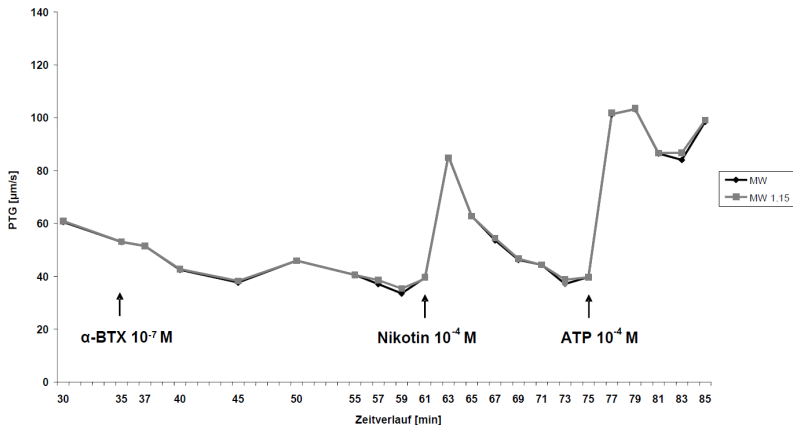


Abb. 4.9: Darstellung der PTG in einem Tier, in dem das Vorkommen der $\alpha 7$ - und der $\alpha 9$ -Untereinheit mittels RT-PCR nachgewiesen wurde. Die Nikotinantwort ist durch Antagonisierung dieser Rezeptoren mit α -BTX nicht gehemmt. Dargestellt sind die Mittelwerte der PTG aller Partikel eines Versuchs (schwarze Kurve) und die Mittelwerte der PTG von Partikeln deren zurückgelegter Weg zwischen Start- und Endpunkt nicht mehr als 15 % vom idealen Weg abweicht (graue Kurve).

4.2.3 PTG nach Zugabe von α -BTX und Dh β E, Nikotin und ATP

Um die Möglichkeit eines zusammengesetzten Rezeptors bestehend aus der $\alpha 7$ - und der $\beta 2$ -Untereinheit (Liu et al., 2009) zu untersuchen, wurden beide Antagonisten zusammen eingesetzt (Abb. 4.10). Die PTG wies nach einem Startwert von $77,2 \pm 4,9 \mu\text{m/s}$ bis zur Zugabe von Nikotin in Minute 61 ein signifikantes Abfallen auf ($p \leq 0,001$). Die Zugabe von 10^{-4} M Nikotin (Minute 61) bewirkte einen signifikanten Anstieg der PTG von $36,3 \pm 4,0 \mu\text{m/s}$ auf $83,1 \pm 18,1 \mu\text{m/s}$ ($p = 0,033$). Die Zugabe von ATP in einer Konzentration von 10^{-4} M in Minute 75 bewirkte einen signifikanten Anstieg der PTG von $45,5 \pm 4,3 \mu\text{m/s}$ auf $104,6 \pm 7,5 \mu\text{m/s}$ ($p = 0,001$).

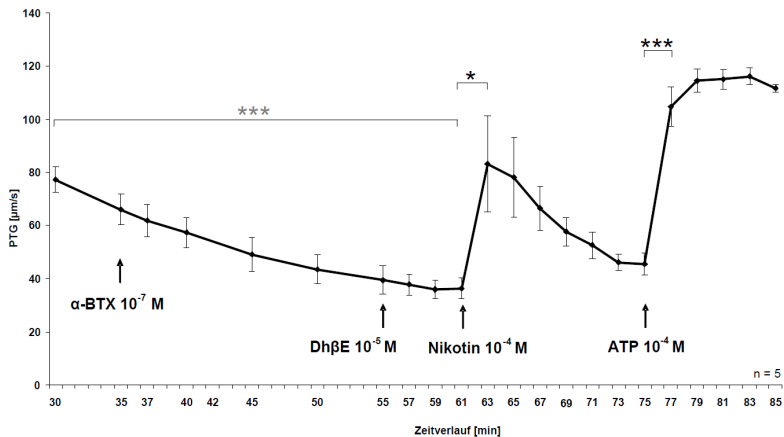


Abb. 4.10: PTG nach Zugabe von α -BTX, Dh β E, Nikotin und ATP. Die Nikotingabe bewirkt einen Anstieg der PTG. Dargestellt sind der MW in $\mu\text{m/s}$ und der SEM. * $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$. t-Test ($n = 5$)

4.2.3.1 Expression der $\alpha 3$ -, $\alpha 4$ -, $\alpha 7$ -, $\alpha 9$ -, $\beta 2$ - und $\beta 4$ -Untereinheiten des nAChRs

Das Trachealepithel wurde nach den PTG-Versuchen mit α -BTX und Dh β E auf die Expression der o.g. Untereinheiten untersucht. Die amplifizierte Gensequenzen wurden als einzelne Banden in den erwarteten Produktgrößen detektiert. Messenger RNA für die $\beta 2$ -Untereinheit wurde in 5 von 5 Tieren (100 %) nachgewiesen. Bei 4 von 4 Tieren (100 %) wurde im abgeschabten Trachealepithel mRNA für die $\alpha 7$ -Untereinheit nach-

gewiesen. In 3 von 3 Tieren (100 %) wurde mRNA für die $\beta 4$ -Untereinheit detektiert. In 3 von 4 Tieren (75 %) wurde mRNA für die $\alpha 3$ -Untereinheit nachgewiesen. Bei 3 von 4 Tieren (75 %) wurde mRNA für die $\alpha 4$ -Untereinheit nachgewiesen. 1 von 5 Tieren (20 %) wies mRNA für die $\alpha 9$ -Untereinheit auf (Tab. 4.5).

In allen untersuchten Proben wurde sowohl die $\alpha 7$ - als auch die $\beta 2$ -Untereinheit nachgewiesen. Da in diesen Tieren keine Hemmung der Nikotinantwort erfolgte, konnte die Beteiligung eines aus diesen Untereinheiten zusammengesetzten Rezeptors am Partikeltransport ausgeschlossen werden. Desweiteren wurden in Maus Nr. 5 alle durch Dh β E und α -BTX zu blockenden Untereinheiten detektiert. Dass speziell in diesem Tier (Abb. 4.11) keine Blockade der Nikotinantwort möglich war, bestätigt die unter 4.2.1 und 4.2.2 gemachten Beobachtungen.

Tier Nr. / nAChR-Untereinheit	1	2	3	4	5
$\alpha 3$	+		Ø	+	+
$\alpha 4$		+	Ø	+	+
$\alpha 7$	+		+	+	+
$\alpha 9$	Ø	Ø	Ø	Ø	+
$\beta 2$	+	+	+	+	+
$\beta 4$			+	+	+

Tab. 4.5: Expression der nAChR $\alpha 3$ -, $\alpha 4$ -, $\alpha 7$ -, $\alpha 9$ -, $\beta 2$ - und $\beta 4$ -Untereinheit im Trachealepithel von C57/Bl6 Mäusen, in denen α -BTX und Dh β E keinen Einfluss auf die Nikotin-induzierte Steigerung der PTG hatten. +: Expression der Untereinheit. Ø: keine Expression der Untereinheit. Schwarze Felder: Trachealepithel wurde nicht auf die entsprechende nAChR-Untereinheit untersucht.

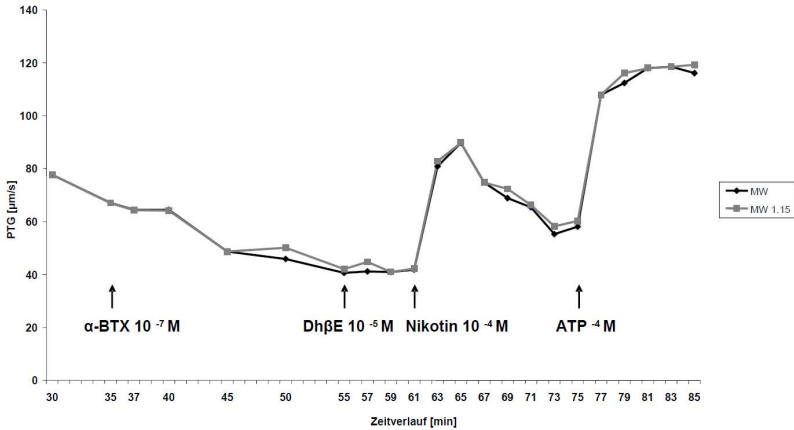


Abb. 4.11: PTG einer Maus, bei der mRNA für die $\alpha 7$ - und die $\beta 2$ -Untereinheit sowie für die $\alpha 3$ -, $\alpha 4$ -, $\alpha 9$ - und $\beta 4$ -Untereinheit nachgewiesen wurde. Eine Hemmung der Nikotin-induzierten Anstiege der PTG durch Antagonisierung dieser Rezeptoren mit α -BTX und Dh β E wurde nicht beobachtet.

4.2.4 PTG nach Zugabe von Strychnin, Nikotin und ATP

Als Antagonist der $\alpha 9$ - und $\alpha 10$ -Untereinheiten des nAChR wurde Strychnin eingesetzt (Abb. 4.12). Die PTG zeigt nach einem Startwert von $90,0 \mu\text{m/s}$ bis zum Zeitpunkt der Nikotingabe in Minute 61 ein signifikantes Abfallen ($p \leq 0,001$). Die Zugabe von Strychnin (min 55) in einer Konzentration von 10^{-4} M hatte ebenso wie die Zugabe von Hepes in den Kontrollversuchen keinen Einfluss auf die PTG (Abb. 4.2). Die Zugabe von 10^{-4} M Nikotin in Minute 61 bewirkte keine Erhöhung der PTG. Die Zugabe von ATP in einer Konzentration von 10^{-4} M in Minute 75 bewirkte einen signifikanten Anstieg der PTG ($p = 0,012$).

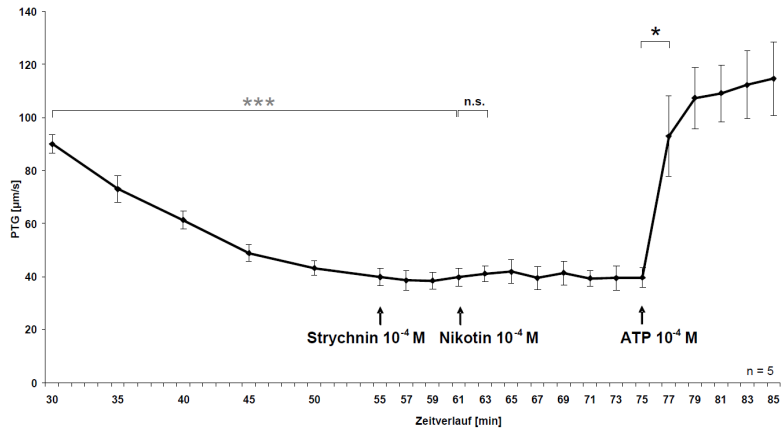


Abb. 4.12: PTG nach Zugabe von 10^{-4} M Strychnin, Nikotin und ATP. Nach der Gabe von Strychnin ist kein Anstieg in der PTG durch Nikotin zu verzeichnen. Dargestellt sind der MW in $\mu\text{m/s}$ und der SEM. $*p \leq 0,05$, $***p \leq 0,001$, nicht signifikant (n.s.): $p > 0,05$. t-Test ($n = 5$)

Die Dosisabhängigkeit der Inhibition durch Strychnin wurde mit 2 weiteren Strychninkonzentrationen (10^{-5} M und 10^{-6} M; jeweils $n = 4$) getestet.

Nikotin-induzierte PTG nach 10^{-5} M Strychninzugabe

Nach einer signifikanten Abnahme der PTG im Vergleich der Startgeschwindigkeit ($93,6 \pm 16,6 \mu\text{m/s}$) zur PTG nach 30 min Versuchsdauer ($49,8 \pm 8,3 \mu\text{m/s}$ in Minute 61; $p = 0,050$), bewirkte die Nikotinzugabe (Minute 63) keine signifikante Steigerung der PTG ($p = 0,112$). Die anschließende Zugabe von ATP erbrachte eine signifikante Erhöhung der PTG von $54,2 \pm 6,5 \mu\text{m/s}$ auf $115,8 \pm 13,1 \mu\text{m/s}$ ($p = 0,014$; Abb. 4.13).

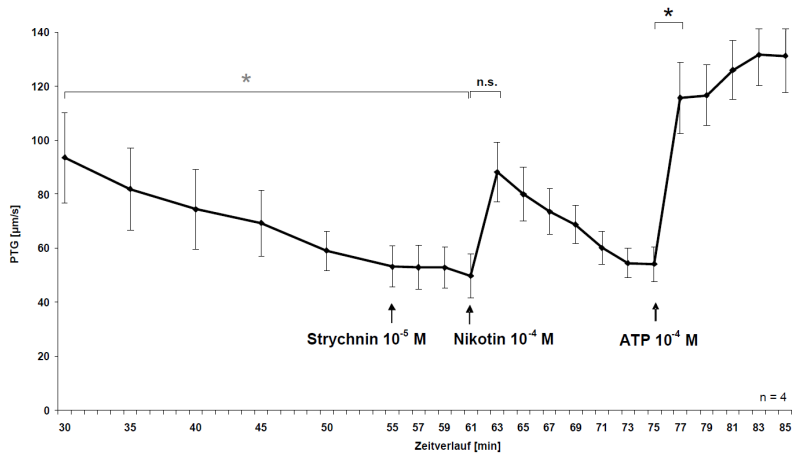


Abb. 4.13: PTG nach Zugabe von 10^{-5} M Strychnin, Nikotin und ATP. Nach der exogenen Zugabe von 10^{-5} M Strychnin bewirkte Nikotin keinen signifikanten Anstieg der PTG. Dargestellt sind der MW in $\mu\text{m/s}$ und der SEM. * $p \leq 0,05$, nicht signifikant (n.s.): $p > 0,05$. t-Test ($n = 4$)

Nikotin-induzierte PTG nach 10^{-6} M Strychninzugabe

Nach einem Startwert von $69,1 \pm 6,5 \mu\text{m/s}$ kam es bis zur Zugabe von Nikotin in Minute 61 zu einer signifikanten Abnahme der PTG ($p = 0,002$) (Abb. 4.14). Zwei Minuten nach Nikotinzugabe wurde ein Anstieg der PTG beobachtet ($p = 0,017$) (PTG von $32,8 \pm 5,5 \mu\text{m/s}$ auf $97,1 \pm 17,8 \mu\text{m/s}$). Danach kam es zu einem signifikanten Abfall der PTG ($p = 0,017$). Die Zugabe von ATP in Minute 75 bewirkte einen signifikante Anstieg der PTG von $54,2 \pm 9,6 \mu\text{m/s}$ auf $88,8 \pm 16,8 \mu\text{m/s}$ ($p = 0,019$).

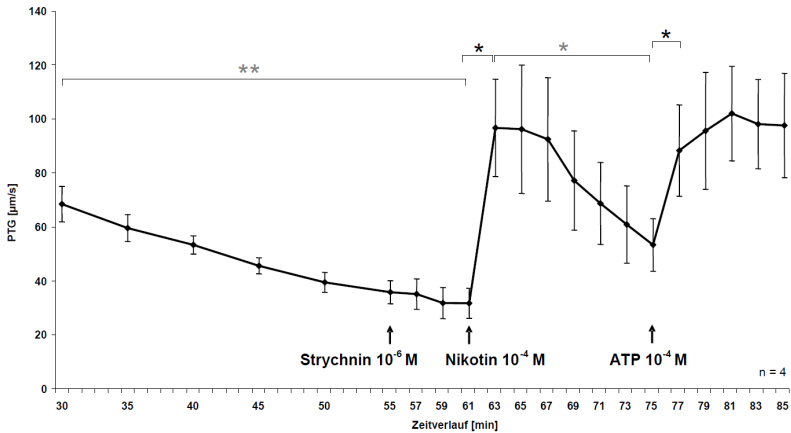


Abb. 4.14: PTG nach Zugabe von 10^{-6} M Strychnin, Nikotin und ATP. Nach Zugabe von Nikotin kommt es zu einem Anstieg der PTG ($p = 0,017$). Dargestellt sind der MW in $\mu\text{m/s}$ und der SEM. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$. t-Test ($n = 4$)

4.2.4.1 Expression der $\alpha 10$ -Untereinheit des nAChR

Die Expression der $\alpha 10$ -Untereinheit des nAChR wurde im abgeschabten Tracheal-epithel von Tracheen ($n = 2$) untersucht, bei denen zuvor 10^{-4} M Strychnin den Nikotin-induzierten Anstieg der PTG aufheben konnte (Abb. 4.15). Bei beiden Tieren wurde mRNA für die $\alpha 10$ -Untereinheit und bei einem mRNA für die $\alpha 9$ -Untereinheit nachgewiesen. Desweiteren wurde in beiden Tieren jeweils mRNA für die $\alpha 4$ -, $\alpha 7$ -, $\beta 2$ - und $\beta 4$ -Untereinheit detektiert. Ein Tier wies mRNA für die $\alpha 3$ - und die $\alpha 5$ -Untereinheit des nAChR auf, während in keinem der beiden Tiere mRNA für die $\alpha 2$ -, $\alpha 6$ - und $\beta 3$ -Untereinheit nachgewiesen wurde. Alle amplifizierte Gensequenzen wurden als einzelne Bande in der erwarteten Produktgröße detektiert.

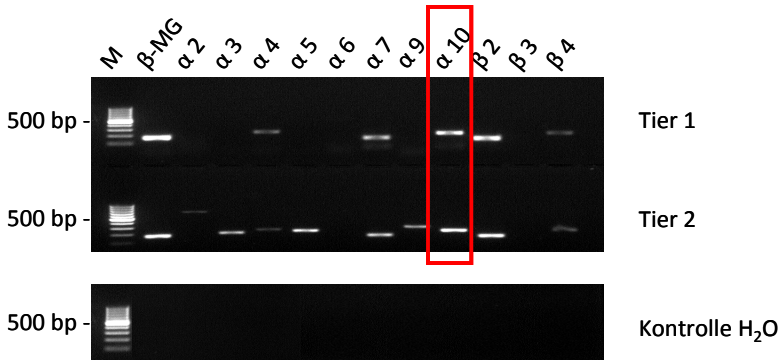


Abb. 4.15: *RT-PCR*. Nachweis der Expression der α 10-Untereinheiten des nAChR in Trachealepithel, das zuvor in Versuchen nach Zugabe von 10^{-4} M Strychnin keine Nikotin-induzierte Steigerung der PTG zeigte. Niedermolekulare Produkte stellen Primer-Dimere dar. M = Basenpaarmarker, β -MG = β -Mikroglobulin, eingesetzt als House-keeping-Gen, H₂O = Negativkontrolle ohne cDNA.

4.2.4.2 Vergleich der Reaktionen auf Nikotin nach Gabe von Strychnin in unterschiedlichen Konzentrationen

Zur Untersuchung der Nikotinantwort nach Zugabe unterschiedlicher Strychninkonzentrationen wurde der Mittelwerte der Differenz in der PTG vor und nach Nikotinalgabe (Minute 61 und 63) für die jeweilige Konzentration gebildet. Im Vergleich der verschiedenen Gruppen ergab die einfaktorielle ANOVA einen signifikanten Unterschied zwischen den Konzentrationsversuchen 10^{-4} M und 10^{-6} M ($p = 0,008$; Abb. 4.16).

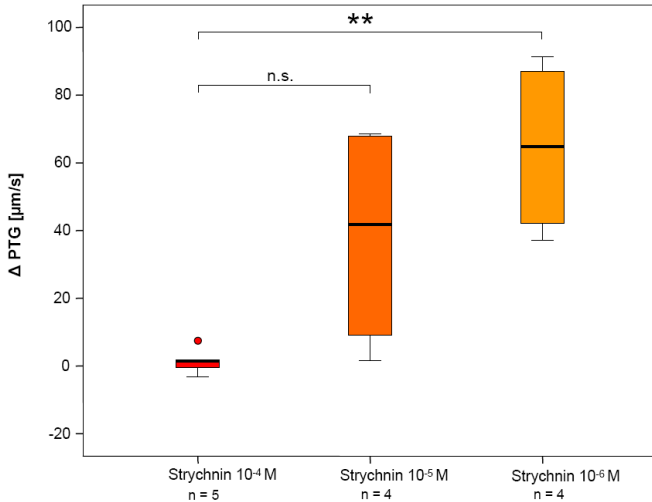


Abb. 4.16: Die Boxplots illustrieren die Anstiege der PTG nach Zugabe von Nikotin bei unterschiedlichen Strychninkonzentrationen. Der Anstieg setzt sich zusammen aus der Differenz der PTG vor und nach exogener Zugabe (Minute 61 - Minute 63) von Nikotin. nicht signifikant (n.s.): $p > 0,05$, $**p \leq 0,01$ (ANOVA). ° = Datenpunkt außerhalb der dreifachen Standardabweichung. Boxplots: Minimum, Maximum und Medianwerte sowie die Perzentile 25 und 75.

4.2.5 Vergleich der Reaktionen auf Nikotin nach Gabe von Hepes und den verschiedenen Antagonisten von nAChR-Untereinheiten

Abschließend wurden die Anstiege in der PTG nach Nikotingabe in den Versuchen mit Antagonistenzugabe jeweils gegen die Kontrollgruppe mit Hepes mittels t-Test getestet und anschließend einer Bonferroni-Korrektur unterzogen. Zwischen der Kontrollgruppe mit Hepes und den Gruppen mit Zugabe der Antagonisten Dh β E, α -BTX und Dh β E + α -BTX ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Nur nach einer Zugabe von 10^{-4} M Strychnin konnte die Geschwindigkeit nicht auf das Niveau der Kontrolle gehoben werden. Es lag hierbei ein signifikanter Unterschied vor ($p \leq 0,001$) (Abb. 4.17).

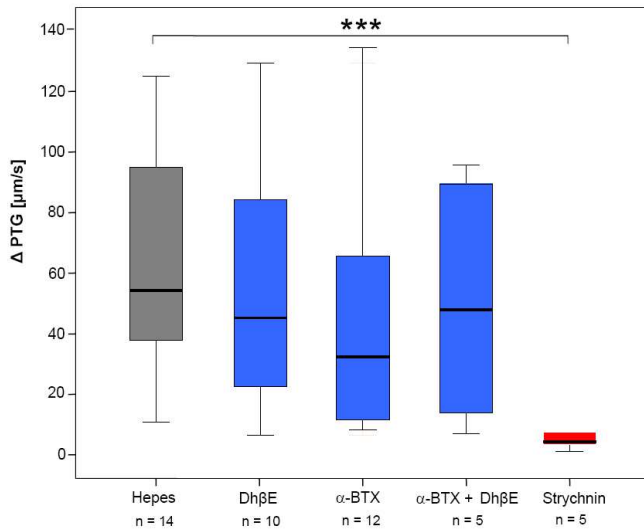


Abb. 4.17: Die Boxplots illustrieren die Anstiege der PTG nach Zugabe von Nikotin. *** $p \leq 0,001$ (t-Test mit Bonferroni-Korrektur). Boxplots: Minimum, Maximum und Medianwerte sowie die Perzentile 25 und 75

4.3 Messung der PTG in der Trachea von $\alpha 3$ -BAC-transgenen eGFP-Mäusen und ihrem korrespondierenden Kontrollmausstamm

$\alpha 3$ -BAC-transgene eGFP-Mäuse wurden eingesetzt, da sie neben der Expression von eGFP unter dem Promoter der $\alpha 3$ -Untereinheit des nAChRs eine Überexpression der $\beta 4$ -Untereinheit aufweisen (Frahm et al., 2011). Um den möglichen Einfluss der $\beta 4$ -Untereinheit auf die PTG zu untersuchen, wurde diese in $\alpha 3$ -BAC-transgenen eGFP-Mäusen und ihrem korrespondierenden Kontrollmausstamm (FVB) untersucht.

4.3.1 PTG bei FVB-Mäusen nach Zugabe von HEPES, Nikotin und ATP

Nach einem Startwert von $92,6 \pm 6,9 \mu\text{m/s}$ in Minute 30 kam es bis zur Zugabe von Nikotin zu einem signifikanten Abfall der PTG ($p = 0,003$) (Abb. 4.18). Nach Zugabe von 10^{-4} M Nikotin in Minute 61 konnte in der nachfolgenden Messung eine signifikante Steigerung der PTG von $61,4 \pm 6,1$ auf $100,2 \pm 12,8 \mu\text{m/s}$ festgestellt werden ($p = 0,021$). Nach der Stimulation mit Nikotin bis zur Zugabe von ATP in Minute 75 wurde erneut ein signifikanter Abfall ($p = 0,049$) der PTG verzeichnet, während ATP einen signifikanten Anstieg ($p = 0,012$) der PTG von $65,8 \pm 19,3 \mu\text{m/s}$ auf $107,0 \pm 12,0 \mu\text{m/s}$ bewirkte.

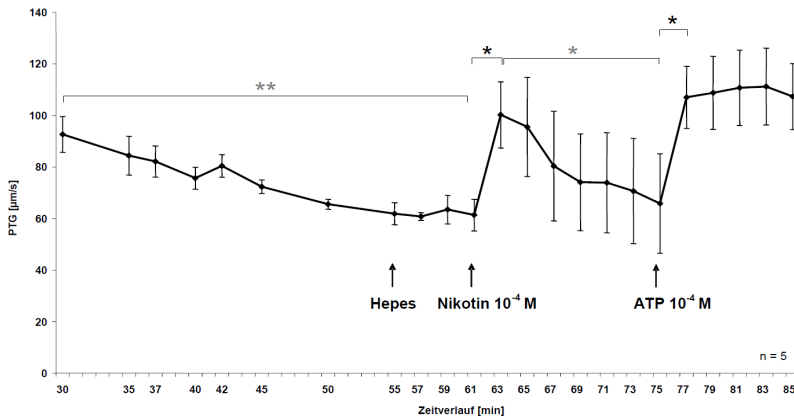


Abb. 4.18: PTG bei FVB-Mäusen nach Zugabe von HEPes, Nikotin und ATP. Die Nikotingabe bewirkt einen Anstieg der PTG. Dargestellt sind der MW in $\mu\text{m/s}$ und der SEM. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$. t-Test ($n = 5$)

4.3.2 PTG bei $\alpha 3$ -BAC-transgenen eGFP-Mäusen nach Zugabe von HEPES, Nikotin und ATP

Nach einem Startwert von $77,7 \pm 8,7 \mu\text{m/s}$ kam es bis zur Zugabe von Nikotin in Minute 61 zu einer signifikanten Abnahme der PTG ($p = 0,017$) (Abb. 4.19). Nach Nikotinzugabe wurde in Minute 63 ein signifikanter Anstieg der PTG von $50,4 \pm 7,4 \mu\text{m/s}$ auf $117,6 \pm 16,6 \mu\text{m/s}$ gemessen ($p = 0,021$). Nach der Stimulation mit Nikotin bis zur Zugabe von ATP in Minute 75 wurde erneut ein signifikanter Abfall ($p = 0,035$) der PTG verzeichnet, während ATP einen signifikanten Anstieg ($p = 0,050$) der PTG von $70,4 \pm 7,2 \mu\text{m/s}$ auf $104,0 \pm 15,2 \mu\text{m/s}$ bewirkte.

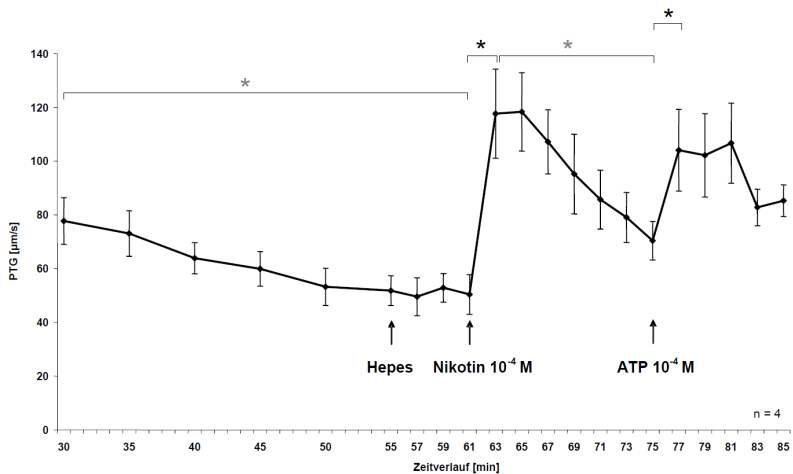


Abb. 4.19: PTG bei $\alpha 3$ -BAC-transgenen eGFP-Mäusen nach Zugabe von HEPES, Nikotin und ATP. Die Nikotinzugabe bewirkt einen Anstieg der PTG. Dargestellt sind der MW in $\mu\text{m/s}$ und der SEM. * $p \leq 0,05$. t-Test ($n = 4$)

4.3.3 PTG bei α 3-BAC-transgenen eGFP-Mäusen nach Zugabe von Dh β E, Nikotin und ATP

Analog zu den in C57/B16-Mäusen mit Dh β E durchgeführten Versuchen, kam es nach Zugabe von 10^{-5} M Dh β E zu einer signifikanten Nikotin-induzierten Steigerung der PTG in Minute 61 von $35,2 \pm 8,1$ $\mu\text{m/s}$ auf $107,2 \pm 10,7$ $\mu\text{m/s}$ ($p = 0,022$; Abb. 4.20). Danach wurde ein signifikanter Abfall der PTG verzeichnet ($p = 0,025$), während ATP einen signifikanten Anstieg ($p = 0,021$) der PTG von $55,0 \pm 5,6$ $\mu\text{m/s}$ auf $93,2 \pm 12,1$ $\mu\text{m/s}$ bewirkte.

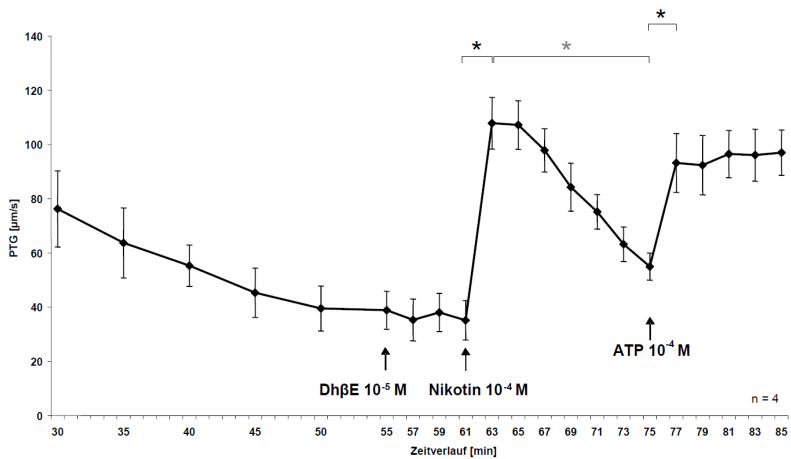


Abb. 4.20: PTG bei α 3-BAC-transgenen eGFP-Mäusen nach Zugabe von 10^{-5} M Dh β E, Nikotin und ATP. Die Nikotingabe bewirkt einen Anstieg der PTG. Dargestellt sind der MW in $\mu\text{m/s}$ und der SEM. * $p \leq 0,05$. t-Test ($n = 4$)

4.3.4 Vergleich der Reaktionen auf Nikotin nach Gabe von Hapes und Dh β E bei FVB- und α 3-BAC-transgenen eGFP-Mäusen

In der einfaktoriellen ANOVA ergab der Vergleich der Nikotin-induzierten Anstiege keine signifikanten Unterschiede in der PTG zwischen den Versuchen mit α 3-BAC-transgenen eGFP-Mäusen mit und ohne Zugabe von Dh β E und den entsprechenden FVB-WT-Mäusen (Abb. 4.21).

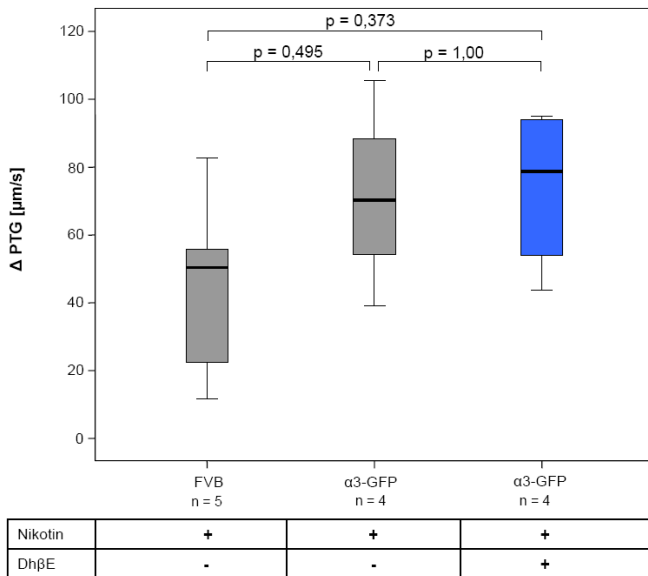


Abb. 4.21: Die Boxplots illustrieren die Anstiege der PTG nach Zugabe von Nikotin (ANOVA). Boxplots: Minimum, Maximum und Medianwerte sowie die Perzentile 25 und 75.

4.4 Immunhistochemie

Im gesamten Trachealepithel sowie in Glattmuskelzellen, Chondrozyten und Nervenzellen der Trachea wurde $\alpha 10$ -Immunreaktivität detektiert (Abb. 4.22). Durch die Verwendung der erst zu einem späteren Zeitpunkt zur Verfügung stehenden für die $\alpha 10$ -Untereinheit des nAChR gendefizienten Mäusen (zur Verfügung gestellt von Vetter et al., 2007) wurde deutlich, dass die Markierung durch die eingesetzten anti- $\alpha 10$ Antikörper unspezifisch ist (Abb. 4.23).

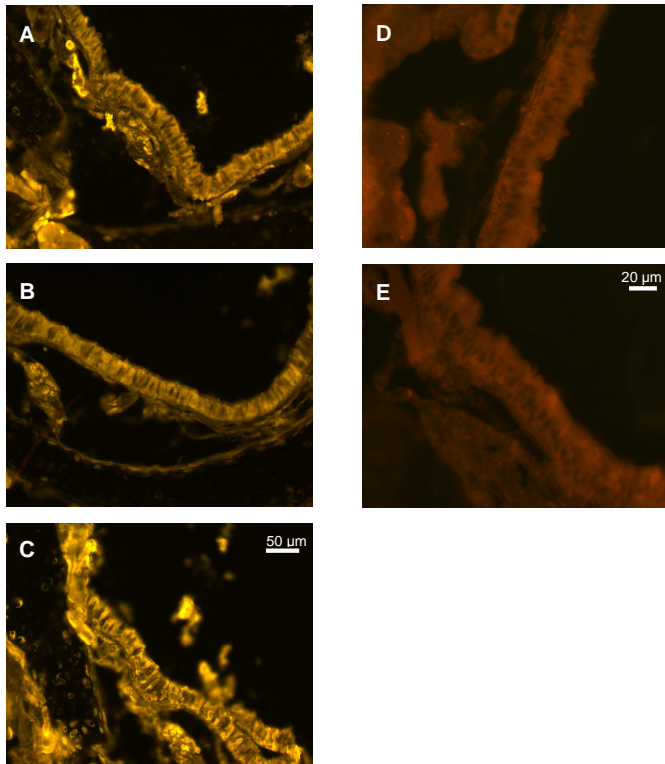


Abb. 4.22: $\alpha 10$ -nAChR-Immunreaktive Zellen in der Trachea der Maus

(A) rb-anti- $\alpha 10$ -Antikörper (90. IT). (B) rb-anti- $\alpha 10$ -Antikörper (61. IT). (C) gp-anti- $\alpha 10$ -Antikörper. (D) Negativkontrolle anti-gp-Ig-Antikörper ohne Primärantikörper. (E) Negativkontrolle anti-rb-Ig-Antikörper ohne Primärantikörper

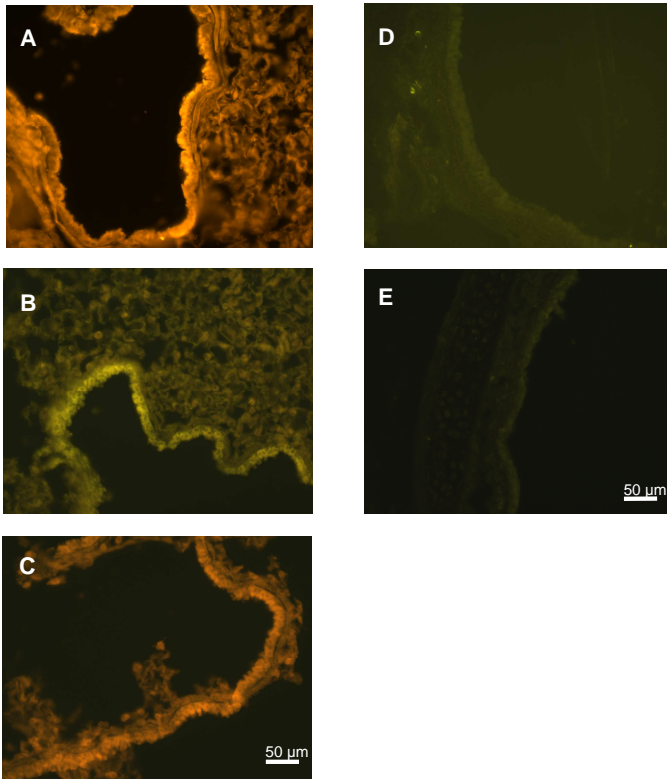


Abb. 4.23: $\alpha 10$ -nAChR-Immunfluoreszenz, Bronchien von $\alpha 10$ -nAChR gendefizienten Mäusen. (A) rb-anti- $\alpha 10$ -Antikörper (90. IT). (B) rb-anti- $\alpha 10$ -Antikörper (61. IT). (C) gp-anti- $\alpha 10$ -Antikörper. (D) Negativkontrolle anti-gp-Ig-Antikörper ohne Primärantikörper. (E) Negativkontrolle anti-rb-Ig-Antikörper ohne Primärantikörper

5 Diskussion

5.1 Beteiligung der Untereinheiten des nAChR an der Stimulation der PTG im Trachealepithel

Über die Wirkung von Nikotin auf die Zilien des respiratorischen Epithels wurde bereits in früheren Publikationen diskutiert. Diese unterscheiden sich jedoch hinsichtlich ihrer Aussage über den beobachteten Effekt. So beschrieben Hahn et al. (1992), dass Nikotin die Zilienschlagfrequenz in der Trachea von Frettchen steigerte. Irvani und Melville (1975) gaben an, dass Nikotin bei der Ratte einen Dosis-abhängigen ziliodepressiven Effekt aufwies. Auch Agius et al. (1995) beobachteten beim respiratorischen Epithel des Menschen nach Zugabe von Cotinin, einem der Hauptmetaboliten von Nikotin, einen signifikanten Abfall der Zilienschlagfrequenz. Diese widersprüchlichen Beobachtungen können sich darauf zurückführen lassen, dass Nikotin außerdem einen stimulierenden Effekt auf die Mukus-Sekretion in der Trachea aufweist (Hümmer et al., 1988) und in den genannten Experimenten (mit Ausnahme von Hahn et al., 1992) der Versuchsaufbau derart gestaltet war, dass die Zilienschlagfrequenz ausschließlich im Zusammenhang mit der die Trachea bedeckenden Mukusschicht untersucht wurde.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde nicht direkt der Zilienschlag einzelner Zilien in der Trachea untersucht, sondern der durch Zilienschlag vermittelte Partikeltransport. Dieser wurde mit Hilfe eines ex vivo Setups an explantierten murinen Tracheen in einem wässrigen Medium ermittelt. Dadurch kann die ziliäre Komponente des Partikeltransports unabhängig vom Einfluss der unter normalen physiologischen Bedingungen die Zilien bedeckenden Mukusschicht beurteilt werden. Der Vorteil dieser Methode ist, dass nicht die Funktion einzelner Zilien, sondern der gerichtete Partikeltransport über einem relativ großen Abschnitt der Trachea gemessen wird. So konnten Klein et al. (2009) unter der Anwendung dieses von ihnen etablierten Modellsystems die Beteiligung MR am ziliären Partikeltransport feststellen. Sie verwendeten Mäuse mit Gendefizienz für den M1-, M2-, oder M3-Rezeptor (M3R), sowie M2M3-Doppel-KO-Mäuse und konnten zeigen, dass der M3R an der Regulation der PTG beteiligt ist.

In der vorliegenden Arbeit konnten Ergebnisse einer vorangegangenen Promotionsarbeit bestätigt werden, dass durch die Stimulation nAChR mittels Nikotin die PTG in der Trachea der Maus zilienvermittelt gesteigert wird. Mecamylamin, ein Antagonist

nAChR, war in der Lage, diese durch Nikotin induzierte Steigerung der PTG vollständig zu hemmen (kommuniziert von I. Boseva, Giessen). In der vorliegenden Arbeit wurden das Rezeptorprofil der vom Trachealepithel exprimierten nAChR-Untereinheiten sowie die Beteiligung einzelner Untereinheiten an der Regulation der PTG bestimmt. Es wurde eine Expressionsanalyse mittels RT-PCR und keine immunohistochemische Untersuchung auf das Vorkommen der nAChR-Untereinheiten durchgeführt, da der größte Teil existierender Antikörper gegen ACh-Rezeptoren unspezifisch bindet (Jositsch et al., 2009). Dies war schlussendlich auch bei 3 hier eingesetzten anti- $\alpha 10$ -Antikörpern der Fall.

Aufgrund der Vielzahl der bestehenden Rezeptoruntereinheiten und der im Vergleich dazu begrenzten Zahl bisher existierender Mausstämmen mit Gendefizienz für die verschiedenen nAChR Untereinheiten (Marubio und Changeux, 2000) war eine Verwendung von Knockout-Mäusen für die verschiedenen Untereinheiten im Rahmen des Screenings nicht realisierbar. So sind bisher 17 Rezeptoruntereinheiten bekannt ($\alpha 1$ - $\alpha 10$, $\beta 1$ - $\beta 4$, γ , δ und ϵ). In der vorliegenden Promotionsarbeit wurden alle neuronalen nAChR Untereinheiten mit Ausnahme der $\alpha 6$ ($\alpha 2$ - $\alpha 10$, $\beta 2$ - $\beta 4$) im Trachealepithel detektiert. Interessanterweise wurde im Trachealepithel der Ratte eine Expression aller α -Untereinheiten außer der $\alpha 9$ gefunden (Kummer et al., 2008). Dies könnte auf ein seltenes Vorkommen der $\alpha 9$ -Untereinheit im Epithel zurückzuführen sein. So wurde die $\alpha 9$ -Untereinheit in der Maus im Rahmen dieser Arbeit in nur 20 % der Trachealepithelproben detektiert. Denkbar ist aber auch, dass es sich hierbei um einen Unterschied zwischen dem Trachealepithel der Maus und der Ratte handelt. Der neuronale nAChR bildet in der Regel Heteromere aus einer α - und einer β -Untereinheit und evtl. einer weiteren α - oder β -Untereinheit. Eine Ausnahme stellen hierbei die Untereinheiten $\alpha 7$ und $\alpha 9$ dar, die außerdem zur Bildung von Homomeren oder Heteromeren aus zwei α -Untereinheiten (z.B. $\alpha 9\alpha 10$) fähig sind (Millar und Gotti, 2009). Daraus ergibt sich eine hohe Zahl potenziell möglicher Zusammensetzungen der unterschiedlichen nAChR-Untereinheiten. Mittels der Expressionsanalyse einer hohen Zahl von Trachealepithelproben aus Tracheen, in denen eine Steigerung des Partikeltransportes beobachtet wurde, konnte eine Beteiligung einiger Untereinheiten ausgeschlossen werden. Besonders häufig wurden die Untereinheiten $\alpha 3$, $\alpha 7$ und $\beta 4$ exprimiert (von ca. 70 % der Tiere). Die Untereinheiten $\alpha 10$ und $\beta 2$ wurden sogar in allen untersuchten Proben detektiert. Deshalb lag der Fokus bei der Funktionsuntersuchung auf diesen Untereinheiten.

Die funktionelle Bedeutung des Vorkommens wurde mittels selektiver Antagonisten spezieller Untereinheiten untersucht. Ein möglicher Kritikpunkt dieser Methode könnte sein, dass die eingesetzten Antagonisten keine 100 %-ige Spezifität aufweisen. Dennoch liefern die vorliegenden Ergebnisse präzise Anhaltspunkte für den Ausschluss der Beteiligung bestimmter Rezeptoren an der Modulation der PTG. Jedoch wird die endgültige Klärung in Versuchen mit nAChR gendefizienten Mäusen erfolgen.

5.1.1 Einfluss der $\alpha 3/4 \beta 2/4$ heteromeren nAChR auf die Stimulation der PTG

Für das in den durchgeführten Versuchen eingesetzte Dh β E gibt McIntosh (2000) für den $\alpha 3\beta 2$ -Rezeptor eine 56x höhere Sensitivität ($IC_{50} = 0,41 \mu M$) als für den $\alpha 3\beta 4$ -Rezeptor an, wodurch gezeigt wird, dass die β -Untereinheit verantwortlich für die Affinitätsveränderung ist. Für die in der vorliegenden Arbeit eingesetzte Konzentration von $10 \mu M$ ist eine Blockierung von 95 % der $\alpha 4\beta 2$ -Rezeptoren, 33 % der $\alpha 3\beta 4\beta 2$ -Rezeptoren und 40 % der $\alpha 7$ -Rezeptoren beim Einsatz in Gehirnschnitten beschrieben (Albuquerque et al. 2009). Die mittlere effektive Konzentration (EC_{50}) zur Antagonisierung der $\alpha 3\beta 4$ -Rezeptoren liegt bei $100 \mu M$ (Xiao et al., 1998). In einem aktuell durchgeführten Versuch zeigte die Zugabe von Dh β E in dieser Konzentration jedoch ebenfalls keinen Effekt auf die Nikotin-induzierte Steigerung der PTG (Daten nicht gezeigt). Die Antagonisierung des $\alpha 7$ -Rezeptors durch Dh β E bezieht sich im oben angeführten Fall wahrscheinlich auf einen heteromeren $\alpha 7$ -Rezeptor zusammen mit einer anderen α - oder β -Untereinheit. Die Annahme der Existenz eines solchen Rezeptors besteht bereits seit längerem. So nahmen Listerud et al. (1991) anhand ihrer Ergebnisse das Vorkommen eines heteromeren $\alpha 7$ -Rezeptors an. Yu und Role (1998) wiesen in sympathischen Neuronen von Hühnerembryonen $\alpha 7$ -beinhaltende nAChR nach, die sich funktionell von homomeren $\alpha 7$ -nAChR unterschieden und für die sie deshalb ebenfalls eine heteromere Rezeptorstruktur annahmen. Übereinstimmend damit wurde auch in der Nomenklatur für nAChR und ihre Subtypen auf die Möglichkeit eines heteromeren $\alpha 7 + \alpha$ - oder β -Untereinheiten umfassenden Rezeptors hingewiesen (Lukas et al., 1999). In Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die $\alpha 7$ -Untereinheit mit der $\alpha 10$ interagieren kann (Lips et al., 2006). Einige Jahre später wurde auch eine Kolo-kalisation der $\alpha 7$ - mit der $\beta 2$ -Untereinheit nachgewiesen (Liu et al., 2009). Dieser $\alpha 7\beta 2$ -Rezeptor konnte in den Versuchen von Liu et al. (2009) ebenfalls durch mikromolare

Konzentrationen Dh β E geblockt werden, welches sich durch die hohe Sensitivität dieses Pharmakons für die β 2-Untereinheit erklären lässt.

Da in den von mir durchgeführten Versuchen nach Zugabe von Dh β E weiterhin ein unveränderter Nikotin-induzierter Anstieg der PTG vorlag, kann eine Beteiligung der α 4 β 2-, α 3 β 2- und α 7 β 2-Rezeptoren an der Regulation der PTG weitestgehend ausgeschlossen werden.

Des Weiteren wurde durch Versuche an α 3-BAC-transgenen eGFP-Mäusen, die eine Überexpression der β 4-Untereinheit des nAChR aufweisen (Frahm et al., 2011), eine maßgebliche Rolle der β 4-Untereinheit an der Modulation der PTG ausgeschlossen. Ansonsten wäre bei den Tieren mit einer Überexpression der β 4-Untereinheit eine verstärkte Nikotinantwort zu erwarten. Jedoch lagen keine signifikanten Unterschiede zwischen der PTG in diesem Mausstamm und seinem korrespondierenden Kontrollmausstamm (FVB) vor.

5.1.2 Einfluss der α 7/ α 9 homomeren nAChR auf die Stimulation der PTG

Während mögliche heteromere Rezeptoren aus α - und β -Untereinheiten höchst wahrscheinlich keine Liganden-Bindungsstelle für das eingesetzte α -BTX aufweisen (Albuquerque et al., 2009), bindet es mit großer Affinität an homomere α 7- und α 9-Rezeptoren (McIntosh, 2000). Alpha-BTX wurde in der vorliegenden Arbeit in einer Konzentration von 100 nM eingesetzt. Eine Absättigung der Rezeptoren wurde bereits für eine 5 nM Konzentration von α -BTX in Zellen des präfrontalen Cortex beschrieben (Dickinson et al., 2008), jedoch benötigt α -BTX eine lange Präinkubation, um seinen maximalen Wirkungseffekt zu erreichen. Mit einer Erhöhung der eingesetzten Konzentration auf 100 nM kann die Inkubationszeit auf 20 min reduziert werden (Gopalakrishnan et al., 1995). Deshalb erfolgte die Zugabe von 100 nM α -BTX in unseren Versuchen abweichend von der Zugabe anderer Antagonisten. Bei dieser Konzentration wurde jedoch keine Hemmung der Nikotin-induzierten Erhöhung der PTG erreicht. Durch den zusätzlichen Einsatz einer 10 μ M Konzentration α -BTX wurde ausgeschlossen, dass die vorangegangene Konzentration zu niedrig war, um die vorhandenen Rezeptoren zu antagonisieren. Yu und Role (1998) geben an, dass bei elektrophysiologisch gemessenen ACh-evozierten Ionenströmen an sympathischen

Neuronen α -BTX bis zu einer 10 μ M Konzentration kleine, aber nachweisbare Effekte auf das Ausmaß der Ströme hat.

Ebenso wenig konnte der durch Nikotin induzierte Anstieg der PTG durch den gemeinsamen Einsatz von α -BTX und Dh β E antagonisiert werden. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass weder ein homomerer Rezeptor, noch ein aus der $\alpha 7$ und einer weiteren β -Untereinheit zusammengesetzter nAChR verantwortlich für die Regulation der PTG sind. Übereinstimmend damit zeigte sich in von uns durchgeführten Experimenten, dass die Stimulation der $\alpha 7$ - (Shaw et al., 2010), $\alpha 4\beta 2$ -, $\alpha 3\beta 2$ - und $\alpha 6\beta 2$ -Untereinheiten des nAChR (O'Leary et al., 2008) durch Zugabe von Cotinin keinen direkten Einfluss auf die PTG ausübt. Darüber hinaus hatte die Zugabe von Cotinin ebenfalls keine Auswirkung auf die Nikotin-induzierte Steigerung der PTG (Daten nicht gezeigt).

5.1.3 Einfluss der $\alpha 9/\alpha 10$ -Untereinheiten des nAChR auf die Stimulation der PTG

Die $\alpha 10$ -Untereinheit des nAChR wurde in 100 % der Epithelproben, die nach Stimulation mit Nikotin einen Anstieg in der PTG aufwiesen, detektiert. In einem nächsten Schritt wurde die funktionelle Bedeutung dieser häufigen Expression gezeigt. Da aktuell kein Antagonist ausschließlich für die $\alpha 10$ -Untereinheit bekannt ist, erfolgte nach Ausschluss der Beteiligung der durch α -BTX und Dh β E zu blockenden Rezeptoren die Untersuchung des Nikotin-Effekts nach Zugabe des $\alpha 9\alpha 10$ -Rezeptorantagonisten Strychnin.

Bei der $\alpha 10$ -Untereinheit handelt es sich um die zuletzt entdeckte Untereinheit des nAChR. Diese wurde in den äußeren Haarzellen des Innenohrs der Ratte identifiziert (Elgoyhen et al., 2001). In den vergangenen Jahren wurde die $\alpha 10$ -Untereinheit in verschiedensten non-neuronalen Geweben nachgewiesen: in Keratinozyten (Kindt et al., 2008), in der Hypophyse der Ratte (Pars tuberalis; Sgard et al., 2002), in der Lunge (Grau et al., 2007), im Urothel der Blase (Bschleipfer et al., 2007) sowie in verschiedenen Zellen des Immunsystems (Lymphozyten, Mastzellen und Alveolarmakrophagen) (Lustig et al., 2001; Mikulski, 2010; Peng et al., 2004). Die Funktion ist nur für die äußeren Haarzellen bekannt. Dort bildet sie zusammen mit der $\alpha 9$ -Untereinheit heteromere Ca^{2+} -permeable Ionenkanäle, die an der efferenten Modulation der Gehörmempfindlichkeit beteiligt sind (Vetter et al., 2007). Trotz einer 58 %-igen Übereinstimmung der

Gensequenzen der die beiden Untereinheiten kodierenden Proteine unterscheidet sich das funktionelle Profil dieses heteromeren $\alpha 9\alpha 10$ -Rezeptors deutlich von dem des homomeren $\alpha 9$ -Rezeptors (Elgoyhen et al., 2001; Sgard et al., 2002). Besonders ausgeprägt ist dieser Unterschied in Bezug auf die Affinität der beiden Rezeptoren zu ACh in Anwesenheit von Ca^{2+} -Ionen. Während eine ACh-Antwort bei $\alpha 9$ -homomeren Rezeptoren durch extrazelluläres Kalzium inhibiert wird, weist die ACh-Reaktion des $\alpha 9\alpha 10$ -Rezeptors ein Kalzium-Konzentration abhängiges Profil auf. So ist die Reaktion unter Kalzium-freien Bedingungen marginal, während sie durch 0,2 mM Konzentrationen Ca^{2+} verstärkt und durch millimolare Konzentrationen Ca^{2+} reduziert wird (Elgoyhen et al., 2001). Den Grund hierfür sehen Elgoyhen et al. (2001) in der funktionellen Differenz der beiden Untereinheiten. Während die $\alpha 9$ -Untereinheit mit dem Liganden interagiert, übernimmt $\alpha 10$ die Funktion, die sonst von der β -Untereinheiten übernommen wird, und moduliert die Affinität (z.B. die Ca^{2+} -Sensitivität) des Rezeptors. Interessanterweise stellt die in der vorliegenden Arbeit untersuchte zilienträgende Zelle einen Vorläufer der äußeren Haarzelle dar (Tanimoto et al., 2011). Des Weiteren gibt es Hinweise, dass die $\alpha 7$ - und $\alpha 10$ -Untereinheiten phylogenetisch die frühesten der nAChR sind und von diesen wiederum $\alpha 10$ die älteste Untereinheit darstellt (Lustig et al. 2001). So könnte es sich im Trachealepithel um einen 'Vorläuferrezeptor' des sich auf der Haarzelle befindenden $\alpha 9\alpha 10$ -Ionenkanal-Rezeptors handeln.

Beim zur Antagonisierung des $\alpha 9\alpha 10$ -Rezeptors eingesetzten Strychnin handelt es sich um einen Glycin-Rezeptor-Antagonisten, der jedoch zugleich Affinität zum $\alpha 9\alpha 10$ -Rezeptor und Serotoninrezeptorsubtyp 3A (5-HT3A) aufweist (Elgoyhen et al., 2001; Baker et al., 2004). Der Glycin-Rezeptor gehört, genauso wie die nAChR und der 5-HT3A Rezeptor, zur Familie der Cys-loop-Rezeptoren (Tsetlin et al., 2011). Die enge genetische Verwandtschaft innerhalb dieser Familie erklärt die mögliche Antagonisierung des nAChR mittels Strychnin.

Strychnin wurde in 3 unterschiedlichen Konzentrationen entsprechend der Literaturangaben eingesetzt. In Keratinozytenkulturen beobachteten Kurzen et al. (2006) bei einer 1 mM Konzentration eine Inhibierung der Differenzierung und der Proliferation der Zellen. Elgoyhen et al. (2001) geben an transfizierten Oozyten eine mittlere effektive Dosis von 20 nM an. Diese große Differenz in eingesetzten Konzentrationen lässt sich durch die unterschiedlichen Systeme erklären. Die Versuche von Elgoyhen et al. (2001) wurden an Oozyten, die mit dem $\alpha 9\alpha 10$ -Rezeptor transfiziert wurden, durchgeführt.

Dies könnte der Grund sein, warum Elgoyhen et al. (2001) bei einer viel geringeren Konzentration von Strychnin eine Antagonisierung des Rezeptors erzielten, im Vergleich zu Versuchen, in denen die Zellen eine natürliche Expression des Rezeptors aufweisen. In unseren Versuchen konnte der durch Nikotin induzierte Anstieg der PTG durch 100 μM Strychnin vollständig gehemmt werden, während nach Zugabe von 1 μM und 10 μM Strychnin weiterhin eine durch Nikotin induzierte Steigerung der PTG zu verzeichnen war. Möglich wäre jedoch, dass die beobachteten Effekte durch die Antagonisierung des Glycin-Rezeptors zustande kommen, welcher dann an den nAChR gekoppelt sein müsste, da die Stimulation der PTG bekanntermaßen durch Nikotin erfolgte. Eine Kopplung des $\alpha 9$ -nAChR an den 5-HT_{3A} Rezeptor (Verbitsky et al., 2003), ebenso wie eine Interaktion zwischen dem nAChR und dem GABAergen Rezeptorsignalweg (Fu et al., 2011) wurde bereits beschrieben. Beim letzteren wurde gezeigt, dass die Aktivierung von nAChR eine gesteigerte Expression aller Elemente des GABAergen Signalwegs zur Folge hat, und dass diese Interaktion zu einer Steigerung der Muzinsekretion führt (Fu et al., 2011). Eine solche Verbindung zwischen dem Glycin-Rezeptor und dem nAChR ist bisher nicht bekannt. Funktionell konnte dies durch aktuell in unserem Institut durchgeführte Versuche ausgeschlossen werden. Eine Stimulation durch Glycin hatte weder einen Einfluss auf die PTG, noch auf die nachfolgende Reaktion nach Nikotinzugabe (Daten nicht gezeigt).

5.2 Beteiligung eines atypischen $\alpha 10$ -nAChR an der durch Nikotin induzierten Steigerung der PTG

Bisher wurde die $\alpha 10$ -Untereinheit ausschließlich als funktionelle Einheit zusammen mit der $\alpha 9$ -Untereinheit beschrieben. Sgard et al. (2002) injizierten die $\alpha 10$ -Untereinheit jeweils zusammen mit der $\beta 2$ -, $\beta 4$ - oder $\alpha 9$ -Untereinheit in Oozyten und konnten danach nur in den $\alpha 9\alpha 10$ exprimierenden Oozyten durch ACh Ionenströme induzieren. Hieraus schlossen sie, dass nur diese Kombination funktionelle Rezeptoren bildet. Diese Schlussfolgerung muss jedoch kritisch betrachtet werden, da sich weder an Lymphozyten noch an Alveolarmakrophagen, in denen funktionierende Rezeptoren nachgewiesen wurden, ACh-induzierte Ionenströme messen ließen (Peng et al., 2004; Mikulski, 2010). Das weist darauf hin, dass die entdeckte Rezeptoruntereinheit zusätzliche atypische Formen annehmen kann, bei denen es sich nicht um Ionenkanäle handelt und deren

Funktion noch weitestgehend unbekannt ist. Das Vorkommen atypischer nAChR, die zumeist über einen metabotropen Signalweg agieren, konnten aktuelle wissenschaftliche Arbeiten bereits belegen. Hollenhorst et al. (2011) beschreiben in Trachealepithelzellen einen solchen nAChR, der über einen metabotropen Signalweg zu einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt. Dieser vermittelt seine Wirkung wahrscheinlich über einen IP_3 -Transduktionsweg. Die genaue Rezeptorkonstellation ist nicht bekannt, jedoch deuten die funktionellen Daten auf eine Beteiligung des $\alpha 9\alpha 10$ -nAChR hin. In den letzten Jahren wurden außerdem verschiedene $\alpha 7$ -nAChR beschrieben, die ebenfalls nicht als Ionenkanäle agieren. So exprimieren T-Zellen einen $\alpha 7$ -nAChR, der keine Ionenkanäle bildet, sondern über Aktivierung der Protein-Tyrosinkinase die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration erhöht (Razani-Boroujerdi et al., 2007). Dasgupta et al. (2006) beschreiben einen $\alpha 7$ -nAChR, der nach Bindung von Nikotin über die Aktivierung von β -Arrestin eine Signalkaskade in Gang setzt, die schlussendlich eine Proliferation von Zellen induziert, und auf Peritonealmakrophagen wurden metabotrope $\alpha 7$ -nAChR identifiziert, die an den Jak2-STAT3 Signalweg gekoppelt sind (de Jonge et al., 2005). Darüber hinaus beschreiben Benfante et al. (2011) auf humanen Monozyten die Expression einer Duplikat-Form des $\alpha 7$ -nAChR und aktuelle Studien zeigen ebenfalls einen Polymorphismus in den Gensequenzen der $\alpha 3$ - und der $\alpha 9$ -Untereinheiten des nAChR (Chikova und Grando, 2011). Für den Genkomplex des $\alpha 5\alpha 3\beta 4$ -nAChR wurden ebenfalls Variationen einzelner Basenpaare, sog. Einzelnukleotid-Polymorphismen (single nucleotide polymorphism, SNP) identifiziert, die mit einer Erhöhung des Risikos, an Lungenkrebs zu erkranken, im Zusammenhang stehen (Saccone et al., 2009; Wang et al., 2010). Ob es sich bei dem von uns beschriebenen $\alpha 10$ -Rezeptor ebenfalls um eine Sequenzvariation des bisher bekannten $\alpha 10$ -Rezeptorgens handelt und das womöglich die Ursache für die unterschiedliche Funktion ist, ist bislang nicht bekannt.

Während Nikotin am $\alpha 9\alpha 10$ -Rezeptorsubtyp als Antagonist bzw. als wirkungslos beschrieben wurde (Elgoyhen et al., 2001), konnte in der vorliegenden Arbeit Nikotin eine Stimulation der PTG bewirken. Dieses Ergebnis ist im Einklang mit dem Befund, dass die Funktion von Mastzellen über eine Interaktion der $\alpha 7$ -, $\alpha 9$ - und $\alpha 10$ -Untereinheit des nAChR moduliert wird und diese Effekte ohne das Vorhandensein von Ionenströmen vermittelt werden (Mishra et al., 2010). Hierbei erfolgte die Aktivierung des nAChR auch durch Nikotin, wohingegen die Zugabe von Cotinin keinen Effekt aufwies (Mishra et al., 2010). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass im Trachealepithel

die $\alpha 10$ -Untereinheit gemeinsam mit anderen Untereinheiten als der $\alpha 9$ einen „atypischen“ Rezeptor bilden kann, der höchst wahrscheinlich nicht als klassischer Ionenkanal fungiert. Darüber hinaus ist es möglich, dass abhängig von der Stöchiometrie der $\alpha 10$ -Untereinheit im Rezeptor andere Affinitäten für Nikotin vorliegen. Dieses Phänomen ist bekannt für den $\alpha 4\beta 2$ -Rezeptor (Tsetlin et al., 2011). Dies zeigt, dass viele unvollständig aufgeklärte und wahrscheinlich noch weitere bisher nicht bekannte Mechanismen Einfluss auf die Rezeptorfunktionalität der nAChR ausüben.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die durch Nikotin induzierte Steigerung der PTG von einem nAChR Rezeptor mit der Beteiligung der $\alpha 10$ -Untereinheit abhängig ist. Dass es sich bei dem von uns untersuchten Rezeptor nicht um den $\alpha 9\alpha 10$ -Rezeptorsubtyp handeln kann, zeigt sich zum einen an den Ergebnissen der RT-PCR-Untersuchung. Dort wurde die Expression der $\alpha 10$ - sowie der $\beta 2$ -Untereinheit als einzige in allen Trachealepithelproben nachgewiesen, während die $\alpha 9$ -Untereinheit lediglich in 20 % der untersuchten Proben exprimiert wurde. Zum anderen bewirkte Nikotin bei den von uns durchgeführten Versuchen einen Anstieg der PTG, während es am $\alpha 9\alpha 10$ -Rezeptorsubtyp als Antagonist bzw. als wirkungslos beschrieben wurde (Elgoyhen et al., 2001). Im Zusammenhang mit der Beobachtung, dass Strychnin als einziger Antagonist in der Lage war, die durch Nikotin induzierte Steigerung der PTG zu blocken, lässt sich aus diesen Ergebnissen schließen, dass ein neuer, bisher nicht beschriebener Rezeptor, der die $\alpha 10$ -Untereinheit beinhaltet, existiert.

6 Zusammenfassung

ACh ist ein klassischer Neurotransmitter, der ebenfalls von vielen non-neuronalen Geweben, so auch Trachealepithelzellen, synthetisiert wird und seine Wirkung über MR und nAChR vermittelt. In non-neuronalen Zellen des Trachealepithels ist die Beteiligung der M3R an der Regulation des Zilienschlags bereits bekannt, und in einer vorangegangenen Promotionsarbeit konnte gezeigt werden, dass durch Stimulation nAChR mittels Nikotin die PTG im Trachealepithel der Maus Zilien-vermittelt gesteigert wird. Die von unserer Arbeitsgruppe etablierte Methode zur Messung der PTG ermöglicht es, die ziliäre Komponente des Partikeltransports unabhängig vom Einfluss der unter normalen physiologischen Bedingungen die Zilien bedeckenden Mukusschicht zu beurteilen. Der Vorteil dieser Methode ist, dass nicht die Funktion einzelner Zilien, sondern der gerichtete Partikeltransport über einem relativ großen Abschnitt der Trachea gemessen wird. Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, welche nAChR-Untereinheiten an der Regulation der Zilien-vermittelten PTG beteiligt sind.

Die nAChR sind in der Zellmembran lokalisierte Liganden-gesteuerte Ionenkanäle, von denen bis heute insgesamt 17 verschiedene Untereinheiten bekannt sind. Daraus ergibt sich eine Vielzahl möglicher zusammengesetzter Rezeptorsubtypen. Die unterschiedliche Zusammensetzung und Stöchiometrie der Rezeptoren beeinflussen dabei nicht nur die Ionenselektivität, sondern resultieren auch in unterschiedlichen Affinitäten für Liganden. Aufgrund dieser Ligandenaffinität konnten zur Abklärung der Beteiligung einzelner Rezeptorsubtypen an der PTG spezifische Antagonisten verschiedener Untereinheiten eingesetzt werden.

Im Anschluss an PTG-Versuche mit erfolgreicher Nikotin-Stimulation wurde das Trachealepithel abgeschabt und in RT-PCR-Untersuchungen die Expression der nAChR-Untereinheiten untersucht. Aufgrund des ermittelten Expressionsprofil wurden in anschließenden PTG-Versuchen die Antagonisten Dh β E (gegen die α 4 β 2-, α 3 β 2-, α 3 β 4-Untereinheiten), α -BTX (gegen die α 7- und α 9-Untereinheiten) sowie Strychnin (gegen die α 9 α 10-Untereinheit) eingesetzt und deren konzentrationsabhängige Wirkung ermittelt. Darüber hinaus wurden PTG-Versuche an α 3-BAC-transgenen eGFP-Mäusen, die neben der Expression von eGFP unter dem Promoter der α 3-Untereinheit des nAChR eine Überexpression der β 4-Untereinheit aufweisen, durchgeführt, um den möglichen

Einfluss der $\beta 4$ -Untereinheit auf die PTG zu untersuchen. In allen durchgeführten Versuchen wurde durch abschließende Zugabe von ATP die Vitalität der Trachea überprüft. Weder die Inhibition der $\alpha 4\beta 2$ -, $\alpha 3\beta 2$ -, $\alpha 3\beta 4$ -Untereinheiten durch Dh β E und der $\alpha 7$ - und $\alpha 9$ -Untereinheiten durch α -BTX, noch die Überexpression der $\beta 4$ -Untereinheit hatten Einfluss auf den durch Nikotin induzierten Anstieg der PTG. Ausschließlich Strychnin, ein Antagonist der $\alpha 9\alpha 10$ -Untereinheit, war in der Lage, die durch Nikotin induzierte Steigerung der PTG vollständig zu hemmen. In dem ermittelten Expressionsprofil wurden in allen untersuchten Trachealepithelproben die Untereinheiten $\alpha 10$ und $\beta 2$ detektiert, während die $\alpha 9$ -Untereinheit in lediglich 20 % der Proben nachgewiesen wurde. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu Publikationen, in denen die $\alpha 10$ -Untereinheit bisher ausschließlich als funktionelle Einheit zusammen mit der $\alpha 9$ -Untereinheit beschrieben wurde. An diesem $\alpha 9\alpha 10$ -Rezeptor wurde darüber hinaus Nikotin als Antagonist bzw. als wirkungslos beschrieben, während es in den von uns durchgeführten Versuchen einen Anstieg der PTG bewirkte. Diese Ergebnisse lassen auf die Existenz eines neuen, bisher nicht beschriebenen Rezeptors, der die $\alpha 10$ -Untereinheit beinhaltet, schließen, der maßgeblich an der Regulation der durch Nikotin induzierten Steigerung der PTG beteiligt ist.

7 Summary

Acetylcholine (ACh) is a classical neurotransmitter that is also synthesized by many non-neuronal cells, such as airway epithelium, and acts via muscarinic (MR) and nicotinic acetylcholine receptors (nAChR). In non-neuronal cells of the airway epithelium it is known that muscarinic receptor M3 (M3R) is involved in regulating ciliary beating. In a previous thesis it was shown that nicotine increases cilia-driven particle-transport speed (PTS) in the tracheal epithelium of the mouse via activation of nAChR. The method of measuring PTS, which was established by our group, makes it possible to evaluate the ciliary component of PTS regardless of mucus, which covers the cilia under physiological conditions. The advantage of this method is that not singular cilia function, but directed particle transport on a long section of the trachea can be investigated. The role of different nAChR subunits in increasing PTS has been less defined yet. The aim of this work was to determine which nAChR subunits are involved in the regulation of cilia-driven PTS.

Nicotinic AChR are ligand-gated ion channels that are localized in the cell membrane. Seventeen different subunits are currently known. This results in a high number of potential receptor subtype compositions. Receptor composition and stoichiometry determine ion-selectivity as well as affinity for different ligands. Based on these ligand-affinities nAChR subunit specific antagonists were utilized to clarify which nAChR subunits are involved in regulating PTS.

After PTS experiments with nicotine stimulation, the tracheal epithelium was abraded and the nAChR subunit expression was analyzed via RT-PCR. Based on the detected expression profile, the antagonists Dh β E (against α 4 β 2-, α 3 β 2-, α 3 β 4-subunits), α -BTX (against α 7- and α 9-subunits) and strychnine (against α 9 α 10-subunit) were applied in PTS experiments and their concentration dependant effect was determined. Furthermore, PTS experiments with α 3-BAC-transgenic eGFP-mice, that in addition to the expression of eGFP under the promoter of nAChR subunit α 3 exhibit overexpression of β 4-subunit, were performed to investigate a possible impact of β 4-subunit on PTS. At the end of each experiment the vitality of the trachea was tested by addition of ATP.

Neither inhibition of α 4 β 2-, α 3 β 2-, α 3 β 4-subunits via Dh β E and α 7- and α 9-subunits via α -BTX, nor overexpression of β 4-subunit did affect the nicotine induced increase of PTS. Only strychnine, an antagonist to nAChR subunits α 9 and α 10, was able to inhibit

the nicotine-induced increase of PTS. RT-PCR exhibited presence of α 10- and β 2-subunit mRNA in all investigated samples of tracheal epithelium, while the α 9-subunit was detected in only 20 % of the samples. This finding is in contrast to the prevailing view that the α 10-subunit serves as a functional unit only in association with the α 9-subunit. Also, nicotine was described as an antagonist or as being ineffective on this α 9 α 10-receptor while in our experiments it was a powerful stimulus of PTS. These results suggest the existence of a new, so far unknown, receptor including nAChR-subunit α 10 which appears to be involved in nicotine induced cilia-driven particle transport in the trachea.

8 Literaturverzeichnis

- Adriaensen D, Brouns I, Pintelon I, De Proost I, Timmermans JP (2006) Evidence for a role of neuroepithelial bodies as complex airway sensors: comparison with smooth muscle-associated airway receptors. *J Appl Physiol* 101(3):960-70.
- Agius AM, Wake M, Pahor AL, Smallman A (1995) The effects of in vitro cotinine on nasal ciliary beat frequency. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 20(5):465-9.
- Albuquerque EX, Pereira EF, Alkondon M, Rogers SW (2009) Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 89(1):73-120.
- Arias HR. 2010. Positive and negative modulation of nicotinic receptors. *Adv Protein Chem Struct Biol* 80:153-203.
- Arneric SP, Holladay MW (2000) Agonists and antagonists of nicotinic acetylcholine receptors. In: Clementi F, Fornasari D, Gotti C (Hrsg.). *Neuronal nicotinic receptors*. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg. S. 419-454.
- Arvidsson U, Riedl M, Elde R, Meister B (1997) Vesicular acetylcholine transporter (VACHT) protein: a novel and unique marker for cholinergic neurons in the central and peripheral nervous systems. *J Comp Neurol* 378(4):454-67.
- Baker ER, Zwart R, Sher E, Millar NS (2004) Pharmacological properties of alpha 9 alpha 10 nicotinic acetylcholine receptors revealed by heterologous expression of subunit chimeras. *Mol Pharmacol* 65(2):453-60.
- Benfante R, Antonini RA, De Pizzol M, Gotti C, Clementi F, Locati M, Fornasari D (2011) Expression of the $\alpha 7$ nAChR subunit duplicate form (CHRFAM7A) is down-regulated in the monocytic cell line THP-1 on treatment with LPS. *J Neuroimmunol* 230(1-2):74-84.
- Bertrand D, Gopalakrishnan M (2007) Allosteric modulation of nicotinic acetylcholine receptors. *Biochem Pharmacol* 74(8):1155-63.
- Boitano S, Evans WH (2000) Connexin mimetic peptides reversibly inhibit Ca^{2+} signaling through gap junctions in airway cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279(4):L623-30.

- Boucher RC (2004) New concepts of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Eur Respir J* 23(1):146-58.
- Brouns I, Oztay F, Pintelon I, De Proost I, Lembrechts R, Timmermans JP, Adriaensen D (2009) Neurochemical pattern of the complex innervation of neuroepithelial bodies in mouse lungs. *Histochem Cell Biol* 131(1):55-74.
- Bschleipfer T, Schukowski K, Weidner W, Grando SA, Schwantes U, Kummer W, Lips KS (2007) Expression and distribution of cholinergic receptors in the human urothelium. *Life Sci* 80(24-25):2303-7.
- Chikova A, Grando SA (2011) Ethnic-specific polymorphisms in *CHRNA3* and *CHRNA9* genes. Abstract, Third International Symposium on Non-neuronal Acetylcholine, Groningen 2011.
- Darvesh S, Hopkins DA, Geula C (2003) Neurobiology of butyrylcholinesterase. *Nat Rev Neurosci* 4(2):131-8.
- Dasgupta P, Rastogi S, Pillai S, Ordonez-Ercan D, Morris M, Haura E, Chellappan S (2006) Nicotine induces cell proliferation by beta-arrestin-mediated activation of Src and Rb-Raf-1 pathways. *J Clin Invest* 116(8):2208-2217.
- de Jonge WJ, van der Zanden EP, The FO, Bijlsma MF, van Westerloo DJ, Bennink RJ, Berthoud HR, Uematsu S, Akira S, van den Wijngaard RM, Boeckxstaens GE (2005) Stimulation of the vagus nerve attenuates macrophage activation by activating the Jak2-STAT3 signaling pathway. *Nat Immunol* 6(8):844-51.
- Dickinson JA, Kew JN, Wonnacott S (2008) Presynaptic alpha 7- and beta 2-containing nicotinic acetylcholine receptors modulate excitatory amino acid release from rat prefrontal cortex nerve terminals via distinct cellular mechanisms. *Mol Pharmacol* 74(2):348-59.
- Edwards JA, Groathouse NA, Boitano S (2005) Bordetella bronchiseptica adherence to cilia is mediated by multiple adhesin factors and blocked by surfactant protein A. *Infect Immun* 73(6):3618-26.
- Elgoyhen AB, Vetter DE, Katz E, Rothlin CV, Heinemann SF, Boulter J (2001) alpha10: a determinant of nicotinic cholinergic receptor function in mammalian vestibular and cochlear mechanosensory hair cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(6):3501-6.

- Falk-Vairant J, Corrèges P, Eder-Colli L, Salem N, Roulet E, Bloc A, Meunier F, Lesbats B, Loctin F, Synguelakis M, Israel M, Dunant Y (1996) Quantal acetylcholine release induced by mediatophore transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(11):5203-7.
- Frahm S, Slimak MA, Ferrarese L, Santos-Torres J, Antolin-Fontes B, Auer S, Filkin S, Pons S, Fontaine JF, Tsetlin V, Maskos U, Ibañez-Tallon I (2011). Aversion to nicotine is regulated by the balanced activity of $\beta 4$ and $\alpha 5$ nicotinic receptor subunits in the medial habenula. *Neuron* 70(3):522-35.
- Fu XW, Wood K, Spindel ER (2011) Prenatal nicotine exposure increases GABA signaling and mucin expression in airway epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 44(2):222-9.
- Fucile S (2004) Ca²⁺ permeability of nicotinic acetylcholine receptors. *Cell Calcium* 35(1):1-8.
- Gahring LC, Rogers SW (2005) Neuronal nicotinic acetylcholine receptor expression and function on nonneuronal cells. *AAPS J* 7(4):E885-94.
- Ganz T (2002) Antimicrobial polypeptides in host defense of the respiratory tract. *J Clin Invest* 109(6):693-7.
- Gheber L, Korngreen A, Priel Z (1998) Effect of viscosity on metachrony in mucus propelling cilia. *Cell Motil Cytoskeleton* 39(1):9-20.
- Gopalakrishnan M, Buisson B, Touma E, Giordano T, Campbell JE, Hu IC, Donnelly-Roberts D, Arneric SP, Bertrand D, Sullivan JP (1995) Stable expression and pharmacological properties of the human alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor. *Eur J Pharmacol* 290(3):237-46.
- Gosens R, Zaagsma J, Grootte Bromhaar M, Nelemans A, Meurs H (2004) Acetylcholine: a novel regulator of airway smooth muscle remodelling? *Eur J Pharmacol* 500(1-3):193-201.
- Gosens R, Zaagsma J, Meurs H, Halayko AJ. 2006. Muscarinic receptor signaling in the pathophysiology of asthma and COPD. *Respir Res* 7:73
- Gotti C, Clementi F (2004) Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Prog Neurobiol* 74(6):363-96.

- Grando SA, Kawashima K, Wessler I (2003) Introduction: the non-neuronal cholinergic system in humans. *Life Sci* 72(18-19):2009-12.
- Grau V, Wilker S, Hartmann P, Lips KS, Grando SA, Padberg W, Fehrenbach H, Kummer W (2007) Administration of keratinocyte growth factor (KGF) modulates the pulmonary expression of nicotinic acetylcholine receptor subunits $\alpha 7$, $\alpha 9$ and $\alpha 10$. *Life Sci* 80(24-25):2290-3.
- Guirao B, Joanny JF (2007) Spontaneous creation of macroscopic flow and metachronal waves in an array of cilia. *Biophys J* 92(6):1900-17.
- Haberberger RV, Pfeil U, Lips KS, Kummer W (2002) Expression of the high-affinity choline transporter, CHT1, in the neuronal and non-neuronal cholinergic system of human and rat skin. *J Invest Dermatol* 119(4):943-8.
- Hagiwara H, Ohwada N, Takata K (2004) Cell biology of normal and abnormal cilio-genesis in the ciliated epithelium. *Int Rev Cytol* 234:101-41.
- Hahn HL, Kleinschrot D, Hansen D (1992) Nicotine increases ciliary beat frequency by a direct effect on respiratory cilia. *Clin Investig* 70(3-4):244-51.
- Hansell MM, Moretti RL (1969) Ultrastructure of the mouse tracheal epithelium. *J Morphol* 128(2):159-69.
- Henning A, Schneider M, Nafee N, Muijs L, Rytting E, Wang X, Kissel T, Grafahrend D, Klee D, Lehr CM (2010) Influence of particle size and material properties on mucociliary clearance from the airways. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv* 23(4):233-41.
- Hollenhorst MI, Lips KS, Weitz A, Krasteva G, Kummer W, Fronius M (2011) Evidence for functional atypical nicotinic receptors that activate K^+ dependent Cl^- secretion in mouse tracheal epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol*.
- Hong KU, Reynolds SD, Watkins S, Fuchs E, Stripp BR (2004) Basal cells are a multi-potent progenitor capable of renewing the bronchial epithelium. *Am J Pathol* 164(2):577-88.
- Horiuchi Y, Kimura R, Kato N, Fujii T, Seki M, Endo T, Kato T, Kawashima K (2003) Evolutional study on acetylcholine expression. *Life Sci* 72(15):1745-56.

- Hümmer B, Purnama I, Hahn HL (1988) Stimulation of submucosal glands by nicotine applied locally to the airway mucosa. *Klin Wochenschr* 66 Suppl 11:161-9.
- Ibañez-Tallon I, Heintz N, Omran H (2003) To beat or not to beat: roles of cilia in development and disease. *Hum Mol Genet* 12 Spec No 1:R27-35.
- Iravani J, Melville GN (1975) Effects of drugs and environmental factors on ciliary movement (author's transl). *Respiration* 32(2):157-64.
- Jositsch G, Papadakis T, Haberberger RV, Wolff M, Wess J, Kummer W (2009) Suitability of muscarinic acetylcholine receptor antibodies for immunohistochemistry evaluated on tissue sections of receptor gene-deficient mice. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 379(4):389-95.
- Kalamida D, Poulas K, Avramopoulou V, Fostieri E, Lagoumintzis G, Lazaridis K, Sideri A, Zouridakis M, Tzartos SJ (2007) Muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors. Structure, function and pathogenicity. *FEBS J* 274(15):3799-845.
- Kawashima K, Misawa H, Moriwaki Y, Fujii YX, Fujii T, Horiuchi Y, Yamada T, Imanaka T, Kamekura M (2007) Ubiquitous expression of acetylcholine and its biological functions in life forms without nervous systems. *Life Sci* 80(24-25):2206-9.
- Kindt F, Wiegand S, Niemeier V, Kupfer J, Löser C, Nilles M, Kurzen H, Kummer W, Gieler U, Haberberger RV (2008) Reduced expression of nicotinic alpha subunits 3, 7, 9 and 10 in lesional and nonlesional atopic dermatitis skin but enhanced expression of alpha subunits 3 and 5 in mast cells. *Br J Dermatol* 159(4):847-57.
- Klapproth H, Reinheimer T, Metzen J, Münch M, Bittinger F, Kirkpatrick CJ, Höhle KD, Schemann M, Racké K, Wessler I (1997) Non-neuronal acetylcholine, a signalling molecule synthesized by surface cells of rat and man. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 355(4):515-23.
- Klein MK, Haberberger RV, Hartmann P, Faulhammer P, Lips KS, Krain B, Wess J, Kummer W, König P (2009) Muscarinic receptor subtypes in cilia-driven transport and airway epithelial development. *Eur Respir J* 33(5):1113-21.
- Knowles MR, Boucher RC (2002) Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *J Clin Invest* 109(5):571-7.

- Krasteva G, Canning BJ, Hartmann P, Veres TZ, Papadakis T, Mühlfeld C, Schliecker K, Tallini YN, Braun A, Hackstein H, Baal N, Weihe E, Schütz B, Kotlikoff M, Ibañez-Tallon I, Kummer W (2011) Cholinergic chemosensory cells in the trachea regulate breathing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(23):9478-83.
- Kummer W, Lips KS, Pfeil U (2008) The epithelial cholinergic system of the airways. *Histochem Cell Biol* 130(2):219-34.
- Kurzen H, Henrich C, Booken D, Poenitz N, Gratchev A, Klemke CD, Engstner M, Goerdts S, Maas-Szabowski N (2006) Functional characterization of the epidermal cholinergic system in vitro. *J Invest Dermatol* 126(11):2458-72.
- Lee RM, Forrest JB (1997) Structure and function of cilia. In: Crystal RG, West JB, Weibel ER (Hrsg.). *The Lung: Scientific Foundations* vol 1. Lippincott-Raven, Philadelphia, S. 459-478
- Leigh MW, Pittman JE, Carson JL, Ferkol TW, Dell SD, Davis SD, Knowles MR, Zariwala MA (2009) Clinical and genetic aspects of primary ciliary dyskinesia/Kartagener syndrome. *Genet Med* 11(7):473-87.
- Lester HA, Xiao C, Srinivasan R, Son CD, Miwa J, Pantoja R, Banghart MR, Dougherty DA, Goate AM, Wang JC (2009) Nicotine is a selective pharmacological chaperone of acetylcholine receptor number and stoichiometry. Implications for drug discovery. *AAPS J* 11(1):167-77.
- Lips KS, König P, Schätzle K, Pfeil U, Krasteva G, Spies M, Haberberger RV, Grando SA, Kummer W (2006) Coexpression and spatial association of nicotinic acetylcholine receptor subunits alpha7 and alpha10 in rat sympathetic neurons. *J Mol Neurosci* 30(1-2):15-6.
- Lips KS, Volk C, Schmitt BM, Pfeil U, Arndt P, Miska D, Ermert L, Kummer W, Koepsell H (2005) Polyspecific cation transporters mediate luminal release of acetylcholine from bronchial epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 33(1):79-88.
- Listerud M, Brussaard AB, Devay P, Colman DR, Role LW (1991) Functional contribution of neuronal AChR subunits revealed by antisense oligonucleotides. *Science* 254(5037):1518-21.
- Liu Q, Huang Y, Xue F, Simard A, DeChon J, Li G, Zhang J, Lucero L, Wang M, Sierks M, Hu G, Chang Y, Lukas R J, Wu J (2009) A novel nicotinic acetylcholine receptor subtype in basal forebrain cholinergic neurons with high sensitivity to amyloid peptides. *J Neurosci* 29(4):918-29.

- Lodish, H, Baltimore D, Berk A, Zipursky LS, Matsudaira P, Darnell J (1995) Cilia and Flagella: Structure and Movement. In: *Molecular Cell Biology*. Third Edition. W. H. Freeman, New York, S. 1079-1090
- Lukas RJ, Changeux JP, Le Novère N, Albuquerque EX, Balfour DJ, Berg DK, Bertrand D, Chiappinelli VA, Clarke PB, Collins AC, Dani JA, Grady SR, Kellar KJ, Lindstrom JM, Marks MJ, Quik M, Taylor PW, Wonnacott S (1999) International Union of Pharmacology. XX. Current status of the nomenclature for nicotinic acetylcholine receptors and their subunits. *Pharmacol Rev* 51(2):397-401.
- Lustig LR, Peng H, Hiel H, Yamamoto T, Fuchs PA (2001) Molecular cloning and mapping of the human nicotinic acetylcholine receptor alpha10 (CHRNA10). *Genomics* 73(3):272-83.
- Maouche K, Medjber K, Zahm J-M, Delavoie F, Michel J, Terryn C, Cloez-Tayarani I, Changeux J-P, Coraux C, Maskos U, Birembaut P, Tournier J-M (2011) alpha7 nicotinic acetylcholine receptor regulates CFTR-chloride-channel function in the human airway epithelium. Abstract, Third International Symposium on Non-neuronal Acetylcholine, Groningen 2011.
- Marubio LM, Changeux J (2000) Nicotinic acetylcholine receptor knockout mice as animal models for studying receptor function. *Eur J Pharmacol* 393(1-3):113-21.
- Massoulié J, Perrier N, Noureddine H, Liang D, Bon S (2008) Old and new questions about cholinesterases. *Chem Biol Interact* 175(1-3):30-44.
- Matsui H, Randell SH, Peretti SW, Davis CW, Boucher RC (1998) Coordinated clearance of periciliary liquid and mucus from airway surfaces. *J Clin Invest* 102(6):1125-31.
- Maus AD, Pereira EF, Karachunski PI, Horton RM, Navaneetham D, Macklin K, Cortes WS, Albuquerque EX, Conti-Fine BM (1998) Human and rodent bronchial epithelial cells express functional nicotinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol* 54(5):779-88.
- McIntosh JM (2000) Toxin antagonists of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor. In: Clementi F, Fornasari D, Gotti C (Hrsg.). *Neuronal nicotinic receptors*. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg. S. 455-476.
- Michel V, Yuan Z, Ramsuvar S, Bakovic M (2006) Choline transport for phospholipid synthesis. *Exp Biol Med (Maywood)* 231(5):490-504.

- Mikulski Z, Hartmann P, Jositsch G, Zasłona Z, Lips KS, Pfeil U, Kurzen H, Lohmeyer J, Clauss WG, Grau V, Fronius M, Kummer W (2010) Nicotinic receptors on rat alveolar macrophages dampen ATP-induced increase in cytosolic calcium concentration. *Respir Res* 11:133.
- Millar NS, Gotti C (2009) Diversity of vertebrate nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology* 56(1):237-46.
- Mishra NC, Rir-sima-ah J, Boyd RT, Singh SP, Gundavarapu S, Langley RJ, Razani-Boroujerdi S, Sopori ML (2010) Nicotine inhibits Fc epsilon RI-induced cysteinyl leukotrienes and cytokine production without affecting mast cell degranulation through alpha 7/alpha 9/alpha 10-nicotinic receptors. *J Immunol* 185(1):588-96.
- Mitic LL, Van Itallie CM, Anderson JM (2000) 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(2):G250-4.
- O'Leary K, Parameswaran N, McIntosh JM, Quik M (2008) Cotinine selectively activates a subpopulation of alpha3/alpha6beta2 nicotinic receptors in monkey striatum. *J Pharmacol Exp Ther* 325(2):646-54.
- Ogura T, Krosnowski K, Zhang L, Bekkerman M, Lin W (2010) Chemoreception regulates chemical access to mouse vomeronasal organ: role of solitary chemosensory cells. *PLoS One* 5(7):e11924.
- Ostrowski LE, Blackburn K, Radde KM, Moyer MB, Schlatter DM, Moseley A, Boucher RC (2002) A proteomic analysis of human cilia: identification of novel components. *Mol Cell Proteomics* 1(6):451-65.
- Pack RJ, Al-Ugaily LH, Morris G, Widdicombe JG (1980) The distribution and structure of cells in the tracheal epithelium of the mouse. *Cell Tissue Res* 208(1):65-84.
- Palma E, Fucile S, Barabino B, Miledi R, Eusebi F (1999) Strychnine activates neuronal alpha7 nicotinic receptors after mutations in the leucine ring and transmitter binding site domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(23):13421-6.
- Park KS, Liang MC, Raiser DM, Zamponi R, Roach RR, Curtis SJ, Walton Z, Schaffer BE, Roake CM, Zmoos AF, Kriegel C, Wong KK, Sage J, Kim CF (2011) Characterization of the cell of origin for small cell lung cancer. *Cell Cycle* 15;10(16):2806-15.

- Pavelka M, Ronge HR, Stockinger G (1976) Comparative study of tracheal epithelium of different mammals. *Acta Anat (Basel)* 94(2):262-82.
- Peng H, Ferris RL, Matthews T, Hiel H, Lopez-Albaitero A, Lustig LR (2004) Characterization of the human nicotinic acetylcholine receptor subunit alpha (alpha) 9 (CHRNA9) and alpha (alpha) 10 (CHRNA10) in lymphocytes. *Life Sci* 76(3):263-80.
- Pfeil U, Lips KS, Eberling L, Grau V, Haberberger RV, Kummer W (2003) Expression of the high-affinity choline transporter, CHT1, in the rat trachea. *Am J Respir Cell Mol Biol* 28(4):473-7.
- Racké K, Juergens UR, Matthiesen S (2006) Control by cholinergic mechanisms. *Eur J Pharmacol* 533(1-3):57-68.
- Razani-Boroujerdi S, Boyd RT, Dávila-García MI, Nandi JS, Mishra NC, Singh SP, Pena-Philippides JC, Langley R, Sopori ML (2007) T cells express alpha7-nicotinic acetylcholine receptor subunits that require a functional TCR and leukocyte-specific protein tyrosine kinase for nicotine-induced Ca²⁺ response. *J Immunol* 179(5):2889-98.
- Riordan JR (2008) CFTR function and prospects for therapy. *Annu Rev Biochem* 77:701-26.
- Rička J (2010) Zilien: Mannschaftsspiel mit Molekularmotoren. Selbstorganisierte Selbstreinigung von Atmungswegen. *Physik in unserer Zeit* 41(2):74–80.
- Robbins RA, Rennard SI (1997) Biology of airway epithelial cells. In: Crystal RG, West JB, Weibel ER (Hrsg.). *The Lung: Scientific Foundations* vol 1. Lippincott-Raven, Philadelphia, S. 445-457.
- Rock JR, Randell SH, Hogan BL (2010) Airway basal stem cells: a perspective on their roles in epithelial homeostasis and remodeling. *Dis Model Mech* 3(9-10):545-56.
- Rowe RK, Brody SL, Pekosz A (2004) Differentiated cultures of primary hamster tracheal airway epithelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 40(10):303-11.
- Rubin BK (2002) Physiology of airway mucus clearance. *Respir Care* 47(7):761-8.

- Saccone NL, Saccone SF, Hinrichs AL, Stitzel JA, Duan W, Pergadia ML, Agrawal A, Breslau N, Gruzca RA, Hatsukami D, Johnson EO, Madden PA, Swan GE, Wang JC, Goate AM, Rice JP, Bierut LJ (2009) Multiple distinct risk loci for nicotine dependence identified by dense coverage of the complete family of nicotinic receptor subunit (CHRN) genes. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 150B(4):453-66.
- Salathe M (2007) Regulation of mammalian ciliary beating. *Annu Rev Physiol* 69:401-22.
- Salathe M, Lipson EJ, Ivonnet PI, Bookman RJ (1997) Muscarinic signaling in ciliated tracheal epithelial cells: dual effects on Ca²⁺ and ciliary beating. *Am J Physiol* 272(2 Pt 1):L301-10.
- Sanderson MJ, Lansley AB, Dirksen ER (1992) Regulation of ciliary beat frequency in respiratory tract cells. *Chest* 101(3 Suppl):69S-71S.
- Sastry BV, Sadavongvivad C (1978) Cholinergic systems in non-nervous tissues. *Pharmacol Rev* 30(1):65-132.
- Satir P, Christensen ST (2007) Overview of structure and function of mammalian cilia. *Annu Rev Physiol* 69:377-400.
- Satir P, Christensen ST (2008) Structure and function of mammalian cilia. *Histochem Cell Biol* 129(6):687-93.
- Satir P, Matsuoka T (1989) Splitting the ciliary axoneme: implications for a "switch-point" model of dynein arm activity in ciliary motion. *Cell Motil Cytoskeleton* 14(3):345-58.
- Sgard F, Charpantier E, Bertrand S, Walker N, Caput D, Graham D, Bertrand D, Besnard F (2002) A novel human nicotinic receptor subunit, alpha10, that confers functionality to the alpha9-subunit. *Mol Pharmacol* 61(1):150-9.
- Shaw JL, Oliver E, Lee KF, Entrican G, Jabbour HN, Critchley HO, Horne AW (2010) Cotinine exposure increases Fallopian tube PROKR1 expression via nicotinic AChRalpha-7: a potential mechanism explaining the link between smoking and tubal ectopic pregnancy. *Am J Pathol* 177(5):2509-15.
- Singla V, Reiter JF (2006) The primary cilium as the cell's antenna: signaling at a sensory organelle. *Science* 313(5787):629-33.

- Sleigh MA (1983) Ciliary function in transport of mucus. *Eur J Respir Dis Suppl* 128 (Pt 1):287-92.
- Song C, Corry B (2009) Role of acetylcholine receptor domains in ion selectivity. *Biochim Biophys Acta* 1788(7):1466-73.
- Sutherland KD, Proost N, Brouns I, Adriaensen D, Song JY, Berns A (2011) Cell of origin of small cell lung cancer: inactivation of Trp53 and Rb1 in distinct cell types of adult mouse lung. *Cancer Cell* 19(6):754-64.
- Tanimoto M, Ota Y, Inoue M, Oda Y (2011) Origin of inner ear hair cells: morphological and functional differentiation from ciliary cells into hair cells in zebrafish inner ear. *J Neurosci* 31(10):3784-94.
- Tsetlin V, Kuzmin D, Kasheverov I (2011) Assembly of nicotinic and other Cys-loop receptors. *J Neurochem* 116(5):734-41.
- Tucek S (1982) The synthesis of acetylcholine in skeletal muscles of the rat. *J Physiol* 322:53-69.
- Van Lommel A, Bollé T, Fannes W, Lauweryns JM (1999) The pulmonary neuroendocrine system: the past decade. *Arch Histol Cytol* 62(1):1-16.
- Verbitsky M, Plazas PV, Elgoyhen AB (2003) Functional expression and properties of a nicotinic alpha9/5-HT3A chimeric receptor. *Neuroreport* 14(15):1931-4.
- Verbitsky M, Rothlin CV, Katz E, Elgoyhen AB (2000) Mixed nicotinic-muscarinic properties of the alpha9 nicotinic cholinergic receptor. *Neuropharmacology* 39(13):2515-24.
- Vetter DE, Katz E, Maison SF, Taranda J, Turcan S, Ballestero J, Liberman MC, Elgoyhen AB, Boulter J (2007) The alpha10 nicotinic acetylcholine receptor subunit is required for normal synaptic function and integrity of the olivocochlear system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(51):20594-9.
- Voynow JA, Rubin BK (2009) Mucins, mucus, and sputum. *Chest* 135(2):505-12.
- Wang J, Spitz MR, Amos CI, Wilkinson AV, Wu X, Shete S (2010) Mediating effects of smoking and chronic obstructive pulmonary disease on the relation between the CHRNA5-A3 genetic locus and lung cancer risk. *Cancer* 116(14):3458-62.

- Wanner A, Salathé M, O'Riordan TG (1996) Mucociliary clearance in the airways. *Am J Respir Crit Care Med* 154(6 Pt 1):1868-902.
- Weisstaub N, Vetter DE, Elgoyhen AB, Katz E (2002) The alpha9alpha10 nicotinic acetylcholine receptor is permeable to and is modulated by divalent cations. *Hear Res* 167(1-2):122-35.
- Wessler I, Kilbinger H, Bittinger F, Unger R, Kirkpatrick CJ (2003) The non-neuronal cholinergic system in humans: expression, function and pathophysiology. *Life Sci* 72(18-19):2055-61.
- Wessler I, Kirkpatrick CJ, Racké K (1998) Non-neuronal acetylcholine, a locally acting molecule, widely distributed in biological systems: expression and function in humans. *Pharmacol Ther* 77(1):59-79.
- Wessler I, Kirkpatrick CJ, Racké K (1999) The cholinergic 'pitfall': acetylcholine, a universal cell molecule in biological systems, including humans. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26(3):198-205.
- Wessler I, Roth E, Deutsch C, Brockerhoff P, Bittinger F, Kirkpatrick CJ, Kilbinger H (2001) Release of non-neuronal acetylcholine from the isolated human placenta is mediated by organic cation transporters. *Br J Pharmacol* 134(5):951-6.
- Wonnacott S, Barik J (2007) Nicotinic ACh receptors. *Tocris Reviews* No. 28.
- Xiao Y, Meyer EL, Thompson JM, Surin A, Wroblewski J, Kellar KJ (1998) Rat alpha3/beta4 subtype of neuronal nicotinic acetylcholine receptor stably expressed in a transfected cell line: pharmacology of ligand binding and function. *Mol Pharmacol* 54(2):322-33.
- Yu CR, Role LW (1998) Functional contribution of the alpha7 subunit to multiple subtypes of nicotinic receptors in embryonic chick sympathetic neurones. *J Physiol* 509 (Pt 3):651-65.
- Zagoory O, Braiman A, Priel Z (2002) The mechanism of ciliary stimulation by acetylcholine: roles of calcium, PKA, and PKG. *J Gen Physiol* 119(4):329-39.

9 Erklärung

Ich erkläre:

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

Ariane Weitz

10 Veröffentlichungen

Originalarbeit

Hollenhorst MI, Lips KS, **Weitz A**, Krasteva G, Kummer W, Fronius M (2011) Evidence for functional atypical nicotinic receptors that activate K⁺ dependent Cl⁻ secretion in mouse tracheal epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol*.

Posterpräsentationen

Weitz A, Hartmann P, Faulhammer P, Boseva I, Ibañez-Tallon I, Kummer W, Krasteva G (2011) Cilia-driven particle transport in mouse respiratory epithelium is stimulated by nicotine. Third International Symposium on Non-Neuronal Acetylcholine, Groningen

Weitz A, Hartmann P, Faulhammer P, Boseva I, Ibañez-Tallon I, Kummer W, Krasteva G (2011) Cilia-driven particle transport in mouse respiratory epithelium is stimulated by nicotine. 28. Arbeitstagung der anatomischen Gesellschaft, Würzburg

11 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei den vielen Menschen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein größter Dank geht an Herrn Prof. Dr. Wolfgang Kummer und Frau Dr. Gabriela Krasteva für die Überlassung des Themas und die herausragende Betreuung dieser Arbeit. Ganz besonders danke ich Frau Dr. Gabriela Krasteva für die umfangreiche Unterstützung und ihr unermüdliches Engagement sowie das freundschaftliche Verhältnis.

Herrn Prof. Dr. Martin Diener danke ich für die Übernahme der Betreuung am Fachbereich Veterinärmedizin.

Für die hervorragende Einarbeitung möchte ich mich bei Petra Hartmann bedanken. Petra Faulhammer danke ich, dass sie bei kleinen und großen Problemen immer ein offenes Ohr für mich hatte. Allen Mitarbeitern des Instituts für Anatomie und Zellbiologie danke ich für die nette Zusammenarbeit und die schöne Zeit.

Für eine lustige und unvergessliche Zeit danke ich meinen "Mit-Doktoranden" Tilman Graulich, Kristina Jung, Lars Wessels und Miriam Wolff.

Meiner Familie danke ich für ihre Liebe und Unterstützung und meinem Freund Philipp dafür, dass er immer für mich da ist.

ISBN 978-3-86345-068-7



**Verlag: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH
35392 Gießen · Friedrichstraße 17 · Tel. 0641 / 24466 · Fax: 0641 / 25375
e-mail: info@divg.net · Homepage: <http://www.divg.de>**