

**Einfluss von Azetylcholin und Eserin  
auf den ziliären Partikeltransport  
im Trachealepithel  
von Azetylcholin- und Butyrylcholinesterase-  
Knockout-Mäusen**

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

vorgelegt von Julia Freidhof  
aus Gießen

Gießen 2009

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie  
Direktorin: Prof. Dr. E. Baumgart-Vogt  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität

Gutachter: PD Dr. K. Lips

Gutachter: PD Dr. K. Mayer

Tag der Disputation: 08.03.2010

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>4</b>
1.1	Das cholinerge System	4
1.1.1	Neuronales und non-neuronales cholinerges System	4
1.1.2	Non-neuronales cholinerges System im Trachealepithel	5
1.1.3	Cholinesterasen: AChE und BuChE	6
1.1.3.1	Die molekulare Struktur der Cholinesterasen	8
1.1.3.2	Nachweis und Aktivität der Cholinesterasen in non-neuronalen Geweben	10
1.2	Das Trachealepithel und dessen Funktion	13
1.2.1	Aufbau der Trachea	13
1.2.2	Das Kinozilium: Zilienschlag und Zilienschlagfrequenz	15
1.2.3	Mukoziliäre Clearance	16
1.3	Fragestellung der Arbeit	17
<b>2</b>	<b>Material und Methode</b>	<b>19</b>
2.1	Chemikalien	19
2.2	Pharmaka	19
2.3	Geräte und Laborbedarf	19
2.4	Messung der Partikeltransportgeschwindigkeit (PTG) in der Trachea	20
2.4.1	Versuchsvorbereitungen	20
2.4.2	Versuchstiere	21
2.4.3	Organentnahme	23
2.4.4	Vorbereitung zur Messung	23
2.4.5	Messung	23
2.4.6	Versuche und Protokolle	24
2.4.7	Auswertung	26
2.4.8	Ausschlusskriterien der Auswertung	27
2.4.9	Statistik	27

<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>28</b>
3.1	Die Wirkung von ACh auf die PTG (ACh-Konzentrationsreihe)	28
3.2	Die Wirkung von Eserin auf die PTG (Eserinkonzentrationsreihe)	36
3.3	Die Wirkung von Eserin auf die ACh-stimulierte PTG	42
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>47</b>
4.1	Methode zur Messung des ziliären Transports	47
4.2	AChE- und BuChE-KO-Mäuse	50
4.3	Cholinesterase-Inhibitoren	53
4.4	Einfluss von ACh auf die PTG im Trachealepithel	55
4.5	Einfluss von Eserin auf die PTG im Trachealepithel	57
4.6	Einfluss von Eserin auf die durch ACh stimulierte PTG im Trachealepithel	58
4.7	Abbau von ACh im respiratorischen Epithel	58
4.8	Schlussfolgerung	61
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>63</b>
<b>6</b>	<b>Summary</b>	<b>65</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>67</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>69</b>

---

<b>9</b>	<b>Danksagung</b>	<b>79</b>
<b>10</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>81</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Das cholinerge System

### 1.1.1 Neuronales und non-neuronales cholinerges System

Azetylcholin (ACh) ist ein wichtiger Neurotransmitter im zentralen und peripheren Nervensystem des Menschen (Klapproth et al. 1997, Wessler et al. 1998). Er wirkt über die Bindung an nikotinischen und muskarinischen Rezeptoren (Wessler et al. 2003). ACh wurde als erster Neurotransmitter 1921 von Otto Loewi als Überträgerstoff am Herz beschrieben und als „Parasympathin“ bezeichnet. 1926 wurde diese Substanz von Loewi und Navratil als ACh identifiziert (Loewi und Navratil 1926). ACh wirkt an präganglionären autonomen Neuronen, postganglionär-parasympathischen Neuronen, an bestimmten (Schweißdrüsen innervierenden) postganglionär-sympathischen Neuronen sowie an der motorischen Endplatte (Starke et al. 1996). Das cholinerge System wurde in Lebewesen nachgewiesen, die bereits seit 2,5 Milliarden Jahren auf der Erde vorkommen wie z.B. Bakterien, Blau- und Grünalgen, Tubellarien, Pilzen, Protozoen und primitiven Pflanzen (Sastry et al. 1978, Grando et al. 2003). Damit konnte das Vorkommen von non-neuronalem ACh bereits lange vor der Entwicklung des Nervensystems nachgewiesen werden. ACh wird von non-neuronalen Zellen verschiedenster Gewebe, so auch von den Atemwegsepithelien, synthetisiert und freigesetzt (Wessler et al. 2001, Proskocil et al. 2004, Kawashima und Fujii 2008, Wessler und Kirkpatrick 2008). In non-neuronalen Zellen (Tab. 1) reguliert ACh über auto- und parakrine Mechanismen Proliferation, Differenzierung, Organisation des Zytoskeletts, Regulation von Zell-Zell-Kontakten, Migration, Zilienaktivität, Sekretion und Absorption. Weiterhin spielt ACh eine wichtige Rolle in der unspezifischen und spezifischen Immunabwehr (Wessler et al. 1998, 2001, Wessler und Kirkpatrick 2001, Wang et al. 2003, Kurzen et al. 2006, Kawashima und Fujii 2008, Wessler und Kirkpatrick 2008).

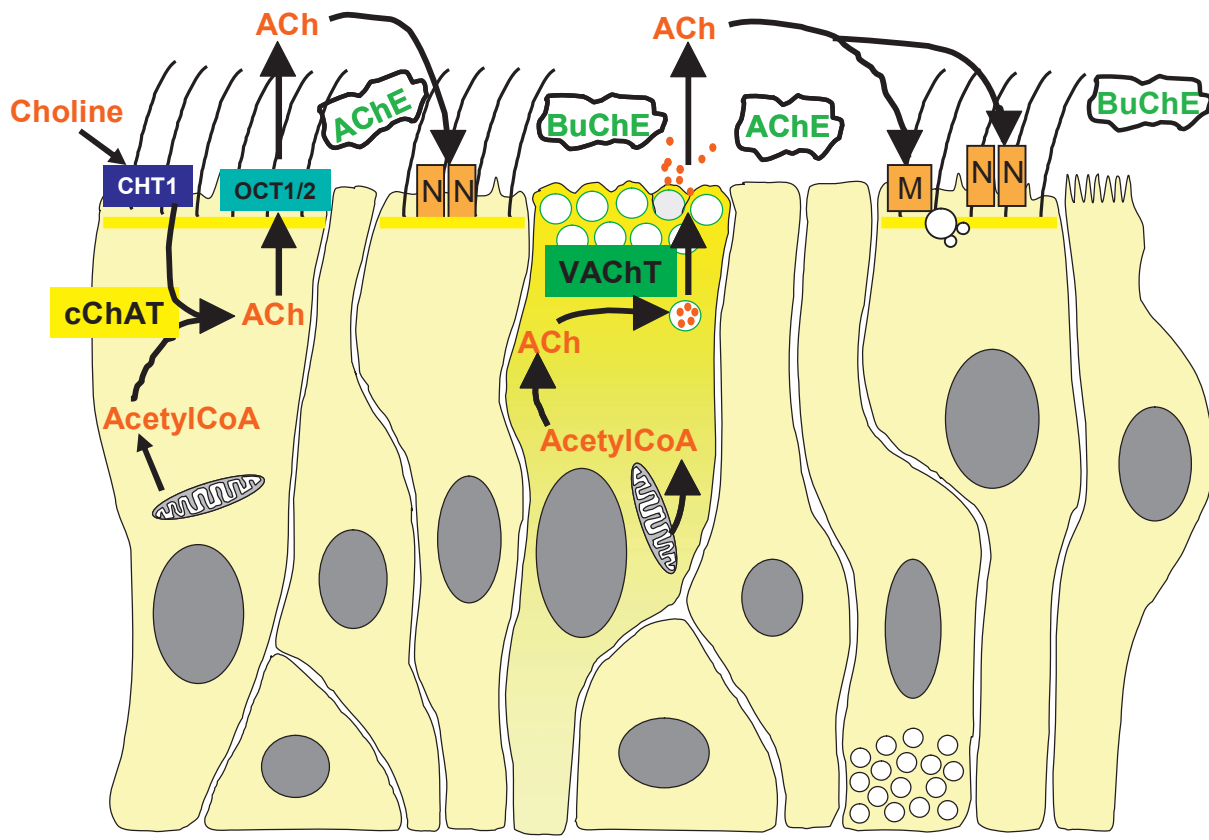
<b>Epithelzellen</b>	
Atemwege	Basalzellen und zilientragende Zellen des Bronchialepithels
Verdauungstrakt	Oralmukosa, Ösophagus, Magen, Jejunum, Ileum, Colon, Sigmoideum, Gallenblase
Urogenitaltrakt	Nierenbecken, Ureter, Harnblase, Vaginalmukosa
Auge	Hornhaut
Haut	Keratinocyten
<b>Mesotheliale Zellen</b>	Viszerale Pleura, Pericard
<b>Blutzellen</b>	Thrombozyten, mononukleäre Zellen
<b>Immunzellen</b>	Mononukleäre Zellen, Alveolarmakrophagen
<b>Andere Zellen</b>	Haare, Nägel, Fettgewebe, Aortenklappe

Tab. 1: Humane non-neuronale Zellen, in denen ACh nachgewiesen wurde (Wessler et al. 1998, Wessler und Kirkpatrick 2008)

### 1.1.2 Non-neuronales cholinerges System im Trachealepithel

Im respiratorischen Epithel von Mensch, Ratte und Maus wurden ACh und verschiedene Komponenten des non-neuronalen cholinergen Systems nachgewiesen (Lips et al. 2005, Kummer et al. 2006). ACh wird im respiratorischen Epithel durch die Cholinazetyltransferase (ChAT) aus AcetylCoA und Cholin synthetisiert (Wessler et al. 2003, Proskocil et al. 2004). Das essentielle Cholin kann wie im Nervensystem durch den hoch-affinen Cholintransporter (CHT1) in bestimmte Zellen des Atemwegsepithel aufgenommen werden (Pfeil et al. 2003). Die Freisetzung von ACh ist im respiratorischen Epithel zelltyp-spezifisch: In den sekretorischen Zellen wird ACh durch den vesikulären Acetylcholintransporter (VAChT) in Vesikel importiert und dann durch vesikuläre Exozytose freigesetzt (Lips et al. 2005). In den kinozilientragenden Zellen wird das zytoplasmatische ACh durch die organischen Kationentransporter 1 und 2 (OCT 1 und 2) direkt freigesetzt (Lips et al. 2005, Kummer et al. 2006). ACh interagiert nach seiner Freisetzung mit muskarinischen und nikotinischen Rezeptoren auf den Zielzellen (Struckmann 2003,

Klein et al. 2009). Im Nervensystem wird ACh durch die Cholinesterasen abgebaut (Wessler und Kirkpatrick 2001, Dobransky und Rylett 2003, Kobayashi et al. 2006). Wie ACh im respiratorischen Epithel abgebaut wird, war bisher noch ungeklärt.



**Abb. 1:** Synthese von ACh im Trachealepithel: Aufnahme von Cholin durch CHT1 in das Zytosol, Synthese von ACh aus AcetylCoA und Cholin mittels ChAT, anschließend Freisetzung von ACh durch VChT vermittelte vesikuläre Exozytose oder direkt aus dem Zytoplasma durch OCT1 und OCT2. Das extrazelluläre ACh bindet auto- und parakrin an nikotinische und muskarinische Rezeptoren.

### 1.1.3 Die Cholinesterasen: AChE und BuChE

Die Cholinesterasen gehören zur großen Gruppe der Serinhydrolasen, die bevorzugt Cholinester spalten. Basierend auf der Substratspezifität lassen sich zwei Hauptvertreter der Cholinesterasen unterscheiden: 1) Die für ACh spezifische AChE, die mit einer katalytischen Effizienz von  $14000 \text{ [s}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{l}]}$  eines der schnellsten



Enzyme ist. 2) Die langsamere BuChE, die außer ACh weitere Cholinester wie zum Beispiel Butyrylcholin, Thiocholin und Acylcholin spalten kann. Sie wird oft als „unspezifische Cholinesterase“ oder Pseudocholinesterase bezeichnet (Massoulié und Bon 1982). Ihre Funktion ist weitgehend ungeklärt (Whittaker 1986, Li et al. 2000). Es wird angenommen, dass die BuChE als Barriere für die Diffusion von ACh in den Blutstrom und gegen oral aufgenommene Toxine fungiert. Bei Menschen, bei denen keine BuChE-Aktivität gemessen werden konnte, wurden keine auffälligen pathologischen Veränderungen festgestellt, abgesehen davon, dass die Atmung nach Abklingen der Narkose mit dem Anästhetikum Succinylcholin nicht wieder einsetzte, da es nicht hydrolysiert werden kann (Lockridge und Masson 2000). Auch Li et al. konnten an BuChE<sup>-/-</sup>-Mäusen als Wirkung auf Succinylcholin eine Atemlähmung nachweisen. Weiterhin reagierten die BuChE<sup>-/-</sup>-Mäuse auf Bambuterol nicht toxisch. Bambuterol ist ein Betasympathomimetikum und wird bei verengten Atemwegen eingesetzt. Durch Erregung spezieller Bindungsstellen (Betarezeptoren) an der Muskulatur der Atemwege erschlafft die verkrampfte Muskulatur und die Bronchien werden weit gestellt. Hingegen führten Pilocarpin, ein muskarinischer Agonist sowie Butyrylcholin bei den getesteten BuChE<sup>-/-</sup>-Mäusen zum Tod und verdeutlichen den Mangel an BuChE-Aktivität beispielhaft für den Menschen (Li et al. 2008). Eine Überdosis von ACh bedingt durch Cholinesterase-Inhibitoren in Pestiziden (Feyereisen 1995) oder chemischen Nervengiften ist toxisch. Als Symptome wurden lokale nekrotische Myopathien, respiratorische Lähmungen bis hin zum Tod beschrieben (Leonard und Salpeter 1979). Militärische Nervengifte und Pestizide werden als organische Phosphorverbindungen (OPC) zusammengefasst. Die AChE wird durch diese inhibiert und es kommt zu einem Überangebot an ACh und einer Überstimulation der Zielorgane. Die Symptome sind abhängig von der Affinität der OPC zu den jeweiligen muskarinischen und/oder nikotinischen Rezeptoren. Die muskarinisch bedingten Symptome umfassen Diarrhö, Harnfluss, Bronchospasmen und erhöhten Speichelfluss und die nikotinischen Symptome äußern sich in Lähmungserscheinungen (Barthold und Schier 2005). In den letzten 25 Jahren haben sich in einigen epidemiologischen Studien OPCs als entwicklungsbedingte Faktoren für die Entstehung von Asthma bei Erwachsenen (Deschamps et al. 1994, Hoppin et al. 2006, 2007, Senthilselvan et al. 1992) und

bevorzugt bei Kindern (Eskenazi et al. 1999, Mannino et al. 2002) gezeigt. In einer relevanten Konzentration bewirken OPCs durch Antigen-Sensibilisierung eine Hyperreaktivität in den Atemwegen (Lein und Fryer 2005, Proskocil et al. 2008). Die Allergisierung ist charakteristisch für 50% der Gesamtbevölkerung sowie für 80% der Asthmatiker (Kinder einbezogen) und hat mit der nachgewiesenen Hyperreaktivität an Meerschweinchen in den Atemwegen Einfluss auf Operations-Risiken und Behandlungsstrategien (Proskocil et al. 2008). Neben diesen vegetativen Wirkungen der AChE-Inhibitoren wurde gezeigt, dass die Hemmung der ACh-Abbauenzyme positive Effekte auf den Verlauf des Morbus Alzheimer haben (Giacobini 2000).

### 1.1.3.1 Die molekulare Struktur der Cholinesterasen

Die Aufklärung der Kristallstruktur des AChE-Moleküls brachte überraschende Erkenntnisse. Die ACh-Bindungsstelle liegt am Boden einer tiefen Grube, die von einer Vielzahl aromatischer Reste umgeben ist (Sussman et al. 1992). Unter Berücksichtigung der hohen katalytischen Umsatzrate der AChE erscheint es verwunderlich, dass die ACh-Bindungsstelle so schlecht zugänglich ist. Mallender et al. beschrieb, dass es sein könnte, dass ACh auch an der peripheren Seite der Grube binden könnte (Mallender et al. 2000). Weiterhin könnten die unterschiedlich geladenen Aminosäuren so angeordnet sein, dass ein elektrostatischer Dipol entsteht, das möglicherweise ACh zur Bindungsstelle leitet (Ripoll et al. 1993, Tan et al. 1993, Porschke et al. 1996). Es gibt verschiedene Isoformen der AChE, die alle aus mehreren Exons zusammengesetzt sind, wobei die Exons 2, 3 und 4 des Gens die codierende Region (katalytische Domäne) darstellen (Soreq et al. 1990). Diese AChE-Isoformen entstehen durch alternatives Spleißen des C-terminalen Endes (Taylor und Radic 1994).

#### **AChE<sub>R</sub>**

Die R-Isoform (R = „Readthrough“) wird durch die Exone 2, 3 und 4 codiert und enthält somit die katalytische Domäne. AChE<sub>R</sub> bildet kugelförmige Monomere, die in embryonalen Geweben und Zellkulturen (Li et al. 1991) sowie in Tumorzellen (Karpel

et al. 1994) nachgewiesen wurden. Weiterhin wurde AChE<sub>R</sub> in den Erythrozyten der Maus, aber nicht des Menschen gefunden (Li et al. 1993). Unter physiologischem Stress und AChE-Inhibition kann AChE<sub>R</sub> im Gehirn von Menschen und Mäusen hochreguliert werden (Kaufer et al. 1998).

### **AChE<sub>H</sub>**

Die H-Isoform (H = „Hydrophobic“) bildet Dimere, die durch Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol (GPI) in der Plasmamembran verankert sind. AChE<sub>H</sub> ist ebenfalls katalytisch aktiv und wird von Exon 2, 3 und 5 gebildet. Am häufigsten wurde die H-Isoform an der Oberfläche von Erythrozyten beobachtet, wo sie das im Blutstrom befindliche ACh abbaut (Liao et al. 1992). Aus diesem Grund wird AChE<sub>H</sub> oft auch als AChE<sub>E</sub> (E = „Erythrocytic“) bezeichnet.

### **AChE<sub>S</sub>**

Die S-Isoform besteht aus Exon 2, 3 sowie 4. Das „S“ in dieser Nomenklatur steht für „Soluble“ (Grisaru et al. 1999). Die AChE<sub>S</sub> bildet kugelförmige Monomere und kommt ausschließlich im Gift bestimmter Schlangen vor (Cousin et al. 1996, Massoulié 2002).

### **AChE<sub>T</sub>**

Die T-Isoform (T = „Tailed“) wird von Exon 2-4 und 6 codiert. Diese Isoform wird auch als AChE<sub>S</sub> bezeichnet, wobei „S“ hier nicht für „Soluble“, sondern für „Synaptic“ steht (Grisaru et al. 1999). Es handelt sich um die Isoform, die am häufigsten in Synapsen gefunden wird. Sie bildet eine Vielzahl verschiedener Oligomere, einerseits lösliche homologe Oligomere wie Monomere, Dimere und Tetramere und andererseits heterogene Tetramere, die durch Kollagen Q (ColQ) in der Basallamina oder prolinreiche Membrananker (PRIMA) in der Plasmamembran verankert sind (Massoulié 2002). Die BuChE, die im Gegensatz zur AChE keine Isoformen aufweist, entspricht in ihrer räumlichen Struktur der AChE<sub>T</sub>-Isoform (Blong et al. 1997). BuChE wird wie AChE<sub>T</sub> über ColQ in der Basallamina verankert (Feng et al. 1999). ColQ besteht aus einer N-terminalen prolinreichen Bindungsdomäne (PRAD), die die Tetramere organisiert, einer zentralen Kollagen-Domäne, die die Tripelhelix bildet

sowie einer cysteinreichen C-terminalen Domäne (Bon et al. 1997, Simon et al. 1998). Die C-terminale Domäne ist jedoch nicht von Bedeutung für die korrekte Bildung der Tripelhelix und die Produktion von Isoformen (Massoulié 2002). Die Kollagen-Domäne enthält zwei Heparinsulfat-Bindungsdomänen, die für die Verankerung von ColQ in der Basallamina verantwortlich sind (Kimbell et al. 2003). PRIMA kann AChE und BuChE in der Plasmamembran verankern und besitzt wie ColQ eine funktionelle PRAD-Domäne, die für die Bildung von Tetrameren aus AChE und BuChE notwendig ist. Im Gehirn und Skelettmuskel von Säugetieren ist ausschließlich PRIMA für die Verankerung von AChE in der Zellmembran zuständig (Perrier et al. 2000, 2002).

### **1.1.3.2 Nachweis und Aktivität von Cholinesterasen im non-neuronalen Gewebe**

In einer Vielzahl von neuronalen und non-neuronalen Geweben konnten die Cholinesterasen AChE und BuChE nachgewiesen werden. Graf und Stockinger (1966) konnten in den zilienträgenden Zellen des Respirationstraktes der Ratte eine azetylcholinesterasehaltige Doppelmembran nachweisen. Bei der untersuchten Schleimhaut der Trachea und des Nasenseptums von erwachsenen Albinoratten ergab der spezifische Nachweis der Azetylcholinesterase mit Azetylthiocholin nach Karnovsky (1964) eine feinkörnige positive Reaktion an der die Basalknötchen verbindenden Doppelmembran. Es wurde beobachtet, dass die Becherzellen sowie die Kernmembran negativ blieben und nur einzelne Flimmerhaare einen schwachen Niederschlag zeigten (Graf und Stockinger 1966). Weitere Untersuchungen ergaben, dass die AChE im nicht-innervierten Teil des Skelettmuskels sowie in Fibroblasten aktiv ist (Koelle 1963, Sastry und Sadavonvivad 1979). Mitchell et al. (1991) beschrieben eine reduzierte AChE-Aktivität in der glatten Muskulatur der Trachea von Kaninchen nach aktiver Immunisierung in vivo. Ebenfalls konnte diese Arbeitsgruppe eine AChE-Aktivität in der glatten trachealen Muskulatur nachweisen (Murphy et al. 1991). In einer weiteren Studie konnte neben der AChE-Aktivität zusätzlich eine BuChE-Aktivität in der glatten Muskulatur der Ratten-Trachea beobachtet werden. Durch die Hemmung der Enzymaktivität von AChE und BuChE

erfolgte eine Hyperaktivität der glatten Atemwegsmuskulatur (Ohrui et al. 1991). Schmidt et al. (1979) stellten die Hypothese auf, dass durch eine reduzierte AChE-Aktivität im Bronchialepithel von Ratten der Bronchialreflex ausgelöst werden kann. Es wurde diskutiert, dass dieser cholinerge Mechanismus zur Erhaltung von einer Hypersekretion bei chronisch-obstruktiven Atemwegserkrankungen beiträgt (Schmidt et al. 1979). Weitere Untersuchungen zu AChE ergaben ein reiches Netzwerk von cholinesterasehaltigen Nervenfasern in den bronchialen Drüsen und zwischen den Acini sowie in der glatten Muskulatur des menschlichen Respirationstrakts. Jedoch konnten innerhalb der Blutgefäße und des Epithels von Bronchen und Bronchiolen keine AChE-positiven Fasern gefunden werden (Partanen et al. 1982). Bei Meerschweinchen konnte AChE im Lungengewebe sowie in der glatten Trachealmuskulatur dargestellt werden. Durch eine reduzierte AChE-Aktivität wurde die Pathogenese einer Hyperreaktion in den Atemwegen ausgelöst (Kadota et al. 2001). Eikermann et al. (2007) wiesen AChE im Musculus genioglossus und Diaphragma nach. Sie beobachteten nach Gabe von Neostigmin (AChE-Inhibitor) ein reduziertes Atemvolumen sowie eine reduzierte Funktion des Musculus genioglossus und des Diaphragmas (Eikermann et al. 2007). Weiterhin wurde 1996 durch Greenfield die AChE-Aktivität in verschiedenen Hirnregionen dargestellt. Durch Untersuchungen an der Ratte konnte die AChE-Aktivität in drei Hirnregionen nachgewiesen werden: Striatum, Hippocampus und Cortex (Kobayashi et al. 2006). Weiterhin wurde die Synthese und Abgabe von Cholinesterasen in den Kreislauf beobachtet. In den Gefäßen der Lunge wurde ebenfalls ein AChE- und BuChE-Aktivität nachgewiesen (Kotevelets et al. 2005). Auch in den Endothelzellen der menschlichen Haut wurde das Vorkommen der AChE beschrieben (Kurzen et al. 2006). Ebenfalls wurde in den Keratinozyten der Haut und der Gingiva AChE nachgewiesen, welches hier für den Abbau von ACh zuständig ist (Nguyen et al. 2000, Kurzen et al. 2006). Es konnte gezeigt werden, dass das cholinerge System in der Haut in autokrine, parakrine und endokrine Mechanismen wie Proliferation der Keratinozyten, Differenzierung, Adhäsion und Fortbewegung, epidermale Schutzfunktion, Blutzirkulation und Immunreaktionen involviert ist (Kurzen et al. 2006). In weiteren Untersuchungen wurde eine AChE-Aktivität in den Fibroblasten der menschlichen Haut (Magnus und Thompson 1954) sowie eine BuChE-Aktivität in

der menschlichen Epidermis (Schallreuter et al. 2006) beobachtet. Ebenfalls wurde in embryonalen Stammzellen ein erhöhtes Vorkommen von cholinergen Markern wie AChE und BuChE beschrieben (Willbold und Layer 1994).

Nicht in allen non-neuronalen Geweben erfolgt der Abbau von ACh durch beide Cholinesterasen (AChE und BuChE). Für die Plazenta wurde gezeigt, dass ACh vorrangig von AChE abgebaut wurde (Sastry 1997), wo hingegen in der Skelettmuskulatur außerhalb der Endplatte hauptsächlich BuChE für den Abbau verantwortlich ist (Norel et al. 1993). Weiterhin ergab die Studie von Norel (1993) eine hohe BuChE-Aktivität im menschlichen Bronchialmuskel. In diesem bronchialen Gewebe wird der Abbau von ACh, neben der AChE, durch die BuChE koreguliert.

Die Cholinesterasen sind in non-neuronalen Geweben sowohl intra- als auch extrazellulär aktiv (Wessler et al. 1999). Die Katalyseaktivität von AChE ist in neuronalen Zellen höher als in non-neuronalen Zellen. In neuronalen Zellen kommt AChE diffus im Zytoplasma, punktuell entlang des Neurits sowie auf der Plasmamembran vor. Im Gegensatz dazu kommt AChE in non-neuronalen Zellen nicht auf der Plasmamembran oder in der Nähe von ihr vor, sondern ist in hohem Maße in der Region um den Zellkern lokalisiert. Dadurch zeigte sich, dass die Anwesenheit von AChE nicht mit deren Katalyseaktivität korreliert (Thullberry et al. 2005). Untersuchungen an AChE<sup>-/-</sup>-Mäusen führten zu der Hypothese, dass in verschiedenen Organen (Herz, Thymus, Leber, Lunge, Milz, Niere, Nebenniere, Pankreas, Dünn- und Dickdarm sowie Magen) die BuChE sowie andere Enzyme einige Funktionen von AChE übernehmen könnten, da in diesen Geweben keine Abnormalitäten bei den AChE<sup>-/-</sup>-Mäusen vorlagen. In den AChE<sup>-/-</sup>-Mäusen konnte jedoch keine erhöhte BuChE-Aktivität nachgewiesen werden und die Hemmung von allen weiteren Enzymen außer AChE führte durch Anwendung organischer Phosphate zum Tod (Xie et al. 2000). Durch den generell hohen Anteil an BuChE in den getesteten Geweben, die motorische Endplatte inbegriffen und durch die Tatsache, dass Mäuse ohne AChE-Aktivität überleben können, postulierten Li et al. (2000), dass die BuChE eine essentielle Funktion hat. Duysen et al. zeigten (2007) ebenfalls, dass die BuChE-Aktivität essentiell ist, da die BuChE ACh in physiologisch

relevanten Regionen wie Diaphragma, Herzmuskel und Gehirn hydrolytisch spalten kann. Jedoch konnte mittels aktuellen Untersuchungen an BuChE<sup>-/-</sup>-Mäusen gezeigt werden, dass beim Menschen eher ein Mangel an BuChE-Aktivität vorliegt (Li et al. 2006, 2008).

## 1.2 Das Trachealepithel und dessen Funktion

### 1.2.1 Aufbau der Trachea

#### Wandaufbau der Trachea

Histologisch wird der Wandaufbau der Trachea in 3 Schichten untergliedert:

1) Die *Tunica mucosa* setzt sich aus dem respiratorischen Epithel und der Lamina propria zusammen, in der sich die seromukösen Glandulae tracheales befinden. Das respiratorische Epithel bildet die luminale Grenzschicht der Trachea.

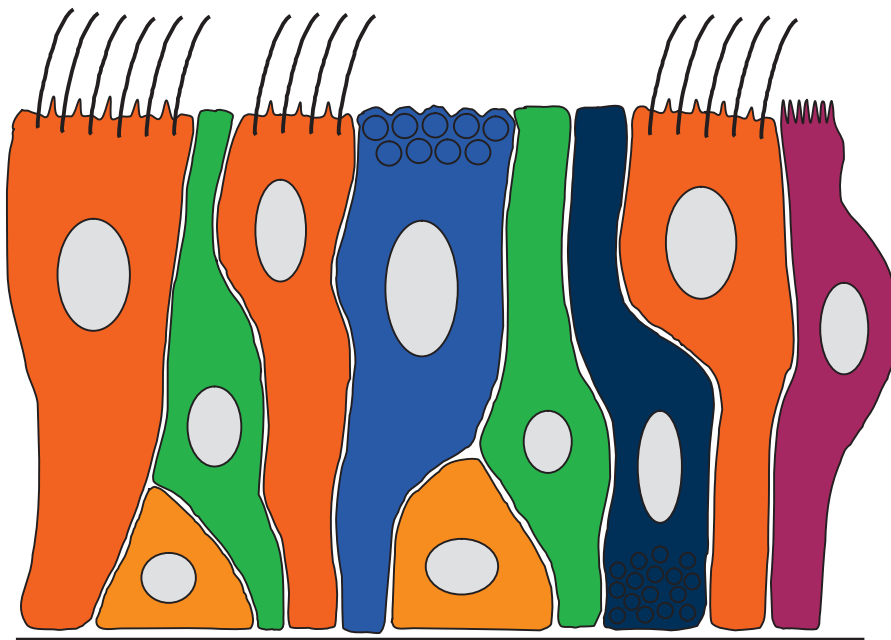
2) Die *Tunica fibromusculocartilaginea* setzt sich beim Menschen aus 16-20 ventrolateral gelegenen, hufeisenförmigen, hyalinen Knorpelspannen zusammen. Diese sind in Längsrichtung durch die Ligamenti anularia verbunden. Dorsal befindet sich der aus glatten Muskelzellen aufgebaute Musculus trachealis.

3) Die *Adventitia*, die aus lockerem Bindegewebe aufgebaut ist, vermittelt den Anschluss der Trachea an die Umgebung.

Bei der Maus entspricht der prinzipielle Wandaufbau dem des Menschen. Die Länge der Trachea bei der Maus beträgt ca. 0,5-0,6 cm.

### Zellen des Trachealepithels

Das respiratorische Trachealepithel kleidet als innerste Schicht (luminal) die Trachea in ihrer gesamten Länge aus. In diesem mehrreihigen, hochprismatischen Epithel kommen neben Kinozilien tragenden, sekretorischen und intermediären Zellen auch Basalzellen, einzelne Bürstenzellen sowie einzelne endokrine Zellen vor. Die Basalzellen sind Vorläuferzellen der Kinozilien tragenden und sekretorischen Zellen, spielen aber auch eine Rolle bei der Befestigung an der Basalmembran (Drenckhahn 2003, Welsch 2003). Die Kinozilien tragenden Zellen sitzen der Basalmembran auf und erreichen die luminalen Oberfläche. Auf der apikalen Seite tragen sie zahlreiche Kinozilien. Ein Kinozilium ist ca. 0,2 µm dick und ca. 2-5 µm lang (Pavelka et al. 1976).



**Abb. 2:** Zellen im Trachealepithel: Die Trachea wird über ihre gesamte Länge mit einem respiratorischen Epithel ausgekleidet. Es handelt sich um ein mehrreihiges, hochprismatisches Epithel. Im Trachealepithel kommen neben **Kinozilien tragenden Zellen**, **sekretorischen Zellen**, **intermediären Zellen** und **Basalzellen** einzelne **Bürstenzellen** sowie einzelne **endokrine Zellen** vor.



### Zell-Zell-Kontakte

Die Zell-Zell-Kontakte zwischen den Zellen des Trachealepithels bestehen aus drei Komponenten eines Verbindungskomplexes (Schneeberger et al. 1997). Die Zonula occludens oder Tight junctions bilden den weit apikal gelegenen Verschlusskontakt. Weiter basal gelegen schließt ein breiter Adhäsionskontakt die Zonula adhaerens an. In basaler Richtung liegen Desmosomen oder die Maculae adhaerens (Schneeberger et al. 1997).

### **1.2.2 Das Kinozilium: Zilienschlag und Zilienschlagfrequenz**

#### Morphologie des Kinoziliums

Die Struktur des Kinozilium der Maus entspricht im Längs- und Querschnitt der Kinozilienstruktur von Pflanzen, Tieren und Menschen (Lee et al. 1997). Das Kinozilium besteht aus 9 Mikrotubulusdoubletten, die ringförmig um ein Mikrotubuluspaar im Zentrum angeordnet sind (Lee et al. 1997). Die Mikrotubulusdoubletten bestehen aus einem kompletten A-Tubulus, der aus 13 Protofilamenten aufgebaut ist und einem inkompletten B-Tubulus, der aus 11 Protofilamenten zusammengesetzt ist (Drenckhahn 2003). Die Tubuli sind untereinander durch den Nexinkomplex verbunden. Jede einzelne Mikrotubulusdoublette steht durch eine Speiche aus Proteinen mit einem Proteinkranz in Kontakt, der die beiden zentralen Mikrotubuli umhüllt (Drenckhahn 2003).

#### Zilienschlag und Zilienschlagfrequenz

Die Bewegung der Kinozilien wird durch eine Gleitbewegung zwischen den benachbarten Mikrotubulusdoubletten bewerkstelligt (Drenckhahn 2003). Der Zilienschlag entsteht durch einen Vorwärtsschlag und eine seitliche

Rückholbewegung der Kinozilien (Wanner et al. 1996). Bei der Vorwärtsbewegung, die viermal schneller ist als die Rückstellbewegung, sind die Zilienarme gestreckt (Drenckhahn 2003), während bei der Rückholbewegung die Zilienarme abgewinkelt sind (Wanner et al. 1996). Eine flimmernde Bewegung entsteht dadurch, dass beim Vorwärtsschlag die Mikrotubulusdoubletten der einen Zilienhälfte und bei der Rückholbewegung die der anderen Zilienhälfte agieren. Durch die koordiniert abwechselnd laufende Gleitbewegung wird der gerichtete Transport ermöglicht (Lee et al. 1997, Drenckhahn 2003). In der menschlichen Trachea läuft die Flimmerbewegung mit einer Frequenz von bis zu 20 Hz ab (Drenckhahn 2003). Die Zilienschlagfrequenz (ZSF) ist temperaturabhängig (Sleigh et al. 1988) und beträgt im Trachealepithel der Maus bei konstanten 30°C  $15,6 \pm 0,7$  Hz (Zhang et al. 2004). Die Flimmertätigkeit kann durch die Zugabe von Pharmaka beeinflusst werden. Erste Untersuchungen an Fröschen zeigen, dass ACh sowie der AChE- und BuChE-Inhibitor Eserin in geringen Konzentrationen die Flimmertätigkeit beschleunigen sollen, wohingegen hohe Konzentrationen hemmend wirken sollen (Kordik et al. 1952). Diese direkte pharmakologische Beeinflussbarkeit der ZSF und der Transportgeschwindigkeit wird auch an der nervalen Kiemenplatte von *Mytilus edulis* (Seemuschel) beobachtet. Nach Applikation von ACh und Eserin wird eine verstärkte Zilienaktivität gemessen (Bülbring et al. 1953). Auch die Zugabe von ATP (100  $\mu$ M) steigert die Schlagfrequenz der zilientragenden Zellen in der Trachea, jedoch nicht in den distalen Atemwegen (Hayashi et al. 2005). Die ZSF bei Säugern wird durch Atropin reduziert (Sasthy et al. 1979, Wanner et al. 1996).

### **1.2.3 Die mukoziliäre Clearance**

#### Das Trachealsekret

Das Innere der Luftröhre wird von dem Trachealsekret benetzt. Das Trachealsekret erfüllt wichtige Aufgaben bei der mukoziliären Clearance (Wanner et al. 1996). Das Trachealsekret der sekretorischen Zellen bildet zusammen mit den Kinozilien des respiratorischen Epithels den mukoziliären Apparat (Drenckhahn 2003). Die

mukoziliäre Clearance ist ein Selbstreinigungsprozess der Atemwege gegenüber eingedrungener Partikel. Hierbei fungiert das Trachealsekret als mechanische Barriere, an dem eingedrungene Fremdkörper, Mikroorganismen und Noxen anhaften. Gemeinsam mit dem Trachealsekret werden diese durch einen koordinierten Zilienschlag kehlkopfwärts transportiert und dort entweder verschluckt oder abgehustet (Wanner et al. 1996). Die Effektivität dieses Reinigungsprozesses ist abhängig von der Interaktion der Zilien mit dem über ihnen liegenden Mukus. Der erfolgreiche Partikeltransport hängt von den Parametern ZSF und der richtigen Quantität sowie viskoelastischen Eigenschaften des Trachealsekrets ab (Knowles et al. 2002). Auch Sleigh et al. (1988) zeigt die Wichtigkeit des Trachealsekrets durch Ersetzen des Mukus durch Ringerlösung, wobei eine Reduktion des Partikeltransportes ohne Veränderung der ZSF beobachtet wird (Sleigh et al. 1988). Neben dem koordinierten Zilienschlag sind für die mukoziliäre Clearance die Interaktion zwischen Nachbarzellen, die Bildung der Mukusschicht sowie Zell-Zell-Kontakte erforderlich. Für die Aktivierung ist das Zusammenspiel zwischen kinezilientragenden und sekretorischen Zellen nötig. Die mukoziliäre Clearance läuft entweder über die Ausschüttung parakrin wirkender Botenstoffe oder über durch Gap junctions vermittelte  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenströme ab (Wanner et al. 1996).

### 1.3 Fragestellung der Arbeit

Im respiratorischen Epithel der Trachea wurde die Synthese und Freisetzung von ACh sowie das Vorkommen von nikotinischen und muskarinischen ACh-Rezeptoren nachgewiesen (Lips et al. 2005, Kummer et al. 2006). Der hydrolytische Abbau von ACh im Trachealepithel ist bisher noch ungeklärt. Erste Hinweise deuten auf die Präsenz der AChE in den Atemwegen hin. Bereits 1966 wiesen Graf und Stockinger eine azetylcholinesterasehaltige Doppelmembran im Respirationstrakt der Ratte nach. Neben der AChE ist auch die BuChE in der Lage ACh durch Hydrolyse abzubauen (Massoulié und Bon 1982). Es gibt bisher keine Untersuchungen über das Vorkommen oder die Aktivität der BuChE in den Atemwegen. In den letzten Jahren wurden AChE- und BuChE-Knockout-Mäuse (KO-Mäuse) generiert (AChE:

Duysen et al. 2000; BuChE: Li et al. 2006, Duysen et al. 2007). Durch die Existenz der Knockout-Mäuse ist es nun möglich, den Abbau von ACh im respiratorischen Epithel mittels eines funktionellen Modells zu untersuchen, das zur Analyse der Zilienfunktion den ziliären Partikeltransport in einer von Klein et al. (2009) etablierten Methode misst.

Zur Analyse dieses Themenkomplexes sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Wird die PTG durch ACh stimuliert?
2. Gibt es Unterschiede in der durch ACh-stimulierten PTG bei AChE<sup>+/-</sup> und ihren korrespondierenden WT?
3. Zeigen sich durch die Zugabe von Eserin, einem Inhibitor der AChE und BuChE, in den verschiedenen Mausstämmen (AChE<sup>+/-</sup>, AChE<sup>+/+</sup>, BuChE<sup>-/-</sup> und BuChE<sup>+/+</sup>-Mäusen) Unterschiede in der PTG und / oder kann Eserin eine Hemmung der PTG bewirken?
4. Wird die durch ACh-stimulierte PTG durch vorherige Zugabe von Eserin beeinflusst?
5. Kann mittels Messung der PTG an AChE<sup>+/-</sup>- und BuChE<sup>-/-</sup>-Mäusen und deren korrespondierenden Wildtypen nachgewiesen werden, ob das vom Trachealepithel freigesetzte ACh durch die AChE und / oder BuChE gespalten wird?

Bis zum heutigen Tag sind Kenntnisse über die Rolle des non-neuronalen cholinergen Systems bei Krankheiten oder Allergien der Atemwege weitestgehend ungeklärt. Von der Beantwortung dieser Fragen werden grundlegende Erkenntnisse über die Funktion des cholinergen Systems der Atemwege erwartet. Diese Grundlagen könnten dazu dienen neue Therapie-Strategien für cholinerge Erkrankungen der Atemwege wie z.B. Asthma bronchiale zu entwickeln.

## 2 Material und Methode

### 2.1 Chemikalien

Kalziumchlorid-2-hydrat	Merck KgaA	Darmstadt, Deutschland
Ethanol absolut	Riedel de Haen AG	Seelze, Deutschland
Glukose	Merck KgaA	Darmstadt, Deutschland
Hepes	Carl Roth GmbH & Co	Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumchlorid-6-hydrat	Merck KgaA	Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co	Karlsruhe, Deutschland
Ampuwa	Fresenius Kabi GmbH	Bad Homburg, Deutschland

### 2.2 Pharmaka

Azetylcholinchlorid (ACh)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland
Adenosintriphosphat (ATP)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland
Eserin Hemisulfat (Eserin)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland
Isofluran	Abbott GmbH & Co. KG	Wiesbaden, Deutschland

### 2.3 Geräte und Laborbedarf

Delta T Kulturschälchen 0,17 mm Bodendicke, klar	Bioprotechs	Butler, USA
Dynabeads	Dynal Biotech	Oslo, Norwegen
Minutien	Insektenbedarf	Karlsbad, Deutschland
Mikroskop BX 50WI	Olympus GmbH	Hamburg, Deutschland

Objektiv UMPlanF1 20x/0.50W	Olympus GmbH	Hamburg, Deutschland
Kamera Imago CCD	T.I.L.L. Photonics GmbH	Gräfelfing, Deutschland
Sylgard 184	Dow Corning GmbH	Wiesbaden, Deutschland
<u>Software:</u>		
Microsoft Office Excel (Excel)	Microsoft Corporation	Redmond, USA
SPSS Version 11.0	Inc. Headquarters	Chicago, Illinois, USA
Tillvision	T.I.L.L. Photonics GmbH	Gräfelfing, Deutschland

## **2.4 Messung der Partikeltransportgeschwindigkeit (PTG) in der Trachea**

### **2.4.1 Versuchsvorbereitungen**

#### Bodenbeschichtung der Kulturschale

Sylgard 184 ist ein klares Silikonelastomer, mit dem die Delta T Kulturschälchen ausgegossen wurden, um die Trachea mit Minutien im Schälchen befestigen zu können. Zur Verarbeitung von Sylgard 184 wurden 9 Teile der Base und 1 Teil des Härters für 2 Stunden (h) bei Raumtemperatur auf einem Magnetrührer gemischt. Nach Entfernung der Luftblasen im Exikator wurden die Delta T Kulturschälchen mit ca. 1,5 ml Sylgard 184 ausgegossen und 4 h bei 65°C oder 1 h bei 100°C im Wärmeschrank auspolymerisiert.

#### Hepes-Ringer-Puffer, pH 7,4

Der Puffer wurde als Medium im Delta T Kulturschälchen und als Spüllösung verwendet. Ein Liter des Puffers wurde nach folgenden Angaben angesetzt:

- 0,418 g Kaliumchlorid (KCl)
- 7,97 g Natriumchlorid (NaCl)
- 1,96 g Glukose
- 2,38 g Hepes
- 1,0 ml 1 M Magnesiumchlorid-6-Hydratlösung ( $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ )
- 2,2 ml 1 M Kalziumchlorid-2-Hydratlösung ( $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ )
- auf 1000 ml mit Aqua dest. auffüllen; auf pH 7,4 einstellen

#### Stocklösungen der verwendeten Pharmaka

Aus dem ACh-Pulver (99%) wurde eine 1 M Stammlösung hergestellt, in der 23,28 mg ACh (molares Gewicht 181,66 g/M) in 128,15  $\mu\text{l}$  Ampuwa gelöst wurden. Eserin (molares Gewicht 324,4 g/M) lag in Form von Salz vor und wurde in 3 ml 96%igem Ethanol zu einer 1 M Stammlösung gelöst. Aus beiden Stammlösungen wurden mittels Ampuwa Verdünnungsreihen erstellt, die aliquotiert im Gefrierschrank bei  $-20^\circ\text{C}$  eingefroren wurden.

ATP (molares Gewicht 507,2 g/M/l) wurde in Hepes-Ringer-Puffer zu einer 100 mM Stammlösung ( $10^{-2}$  M) gelöst, aliquotiert und bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

#### **2.4.2 Versuchstiere**

Die verwendeten Knockout-Mäuse (KO) und deren korrespondierende Wildtyp-Mäuse (WT) wurden von der Arbeitsgruppe von Oksana Lockridge (University of Nebraska Medical Center, Omaha, Nebraska, USA) zur Verfügung gestellt und im Zentralen Tierlabor der Justus-Liebig-Universität in Gießen gezüchtet.

#### AChE-KO-Mäuse ( $\text{AChE}^{-/-}$ ) und deren korrespondierende WT-Mäuse ( $\text{AChE}^{+/+}$ )

Zur Herstellung der homozygoten  $\text{AChE}^{-/-}$ -Mäuse wurden aus dem Mäusestamm 129S6/SvEvTac embryonale Stammzellen (R1) gewonnen und genetisch verändert, indem Exon 2, 3, 4 sowie 5 entfernt und an deren Stelle eine Neomycin-Kassette

eingesetzt wurde. Die veränderten Stammzellen wurden in scheinträchtige Mäuse implantiert und die Chimeren verpaart (Duysen et al. 2002). Das AChE-Gen liegt beim Menschen auf Chromosom 7q22 und bei der Maus auf Chromosom 5 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/HomoloGene/>).

Für die Versuche wurden heterozygote AChE<sup>+/-</sup>-gendifiziente Mäuse verwendet, da die homozygoten AChE<sup>-/-</sup>-Mäuse aufgrund einer Muskelschwäche nur ca. 14 Tage überlebensfähig sind (Duysen et al. 2002) und die Funktion des Trachealepithels zu diesem Zeitpunkt noch nicht vollständig ausgereift ist.

Adulte Tiere beiderlei Geschlechts wurden mittels einer Überdosis Isofluran getötet.

#### BuChE-KO-Mäuse (BuChE<sup>-/-</sup>) und deren korrespondierende WT (BuChE<sup>+/+</sup>)

Zur Herstellung der BuChE<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden aus dem Mäusestamm 129S1/SvImJ embryonale Stammzellen (R1) gewonnen und genetisch verändert, indem 891 Basenpaare (bp) des Gens entfernt wurden. Dies beinhaltete 485 bp am 3'-Ende von Intron 1 und 406 bp am 5'-Ende von Exon 2. Die fehlende Region wurde durch eine Neomycin-Kassette ersetzt. Die veränderten Stammzellen wurden in scheinträchtige Tiere eingesetzt. Das BuChE-Gen liegt auf Chromosom 3 (Li et al. 2006, Duysen et al. 2007).

Für die Versuche wurden adulte Tiere beiderlei Geschlechts mittels einer Überdosis Isofluran getötet.

<u>KO-Mäuse</u>	<u>WT-Mäuse</u>	<u>Genetischer Hintergrund</u>	<u>Lokalisation des Esterase-Gens</u>
AChE <sup>+/-</sup>	AChE <sup>+/+</sup>	129S6/SvEvTac	Chromosom 7q22
BuChE <sup>-/-</sup>	BuChE <sup>+/+</sup>	129S1/SvImJ	Chromosom 3

**Tab. 2:** Genetischer Hintergrund der verwendeten Mäuse



### 2.4.3 Organentnahme

Die Thoraxhöhle wurde mit einem Schnitt durch die Medianebene der Maus eröffnet, der an der ventralen Halsseite bis zum Kehlkopfbereich weitergeführt wurde. Die Trachea wurde freipräpariert und mittels einer Schere direkt kaudal des Kehlkopfes und kranial der Bifurkation abgetrennt. Die Trachea wurde in die Mitte eines mit kaltem (4-8°C) Hepes-Ringer-Puffer gefüllten Delta T Kulturschälchen gelegt (siehe 2.4.4). Die Befestigung der Trachea erfolgte mit 2-3 Minuten in natürlicher Streckung des M. trachealis, der nach oben orientiert war. Der Muskel wurde der Länge nach aufgeschnitten, wobei die gegenüberliegende Epithelseite nicht beschädigt werden durfte. Abschließend erfolgte die Spülung der Trachea mit kaltem Hepes-Ringer-Puffer, um Haare und Präparierreste zu entfernen, die die Messung verändern könnten.

### 2.4.4 Vorbereitung zur Messung

Der kalte Hepes-Ringer-Puffer im Kulturschälchen wurde durch 1,5 ml auf 37°C vorgewärmten Hepes-Ringer-Puffer ausgetauscht. Die Temperatur des Mediums wurde durch ein integriertes Heizsystem über die gesamte Versuchsdauer konstant bei 30°C gehalten. Dazu musste die Trachea in der Mitte des Schälchens aufgespannt werden. Dann wurden 2 µl Dynabeadlösung, in der sich ca. 600000 Polystyrenkügelchen mit einem Durchmesser von etwa 4,5 µm befanden, seitlich der aufgespannten Trachea in das Medium pipettiert. Der ziliäre Transport dieser Partikel konnte unter dem Mikroskop (Olympus BX50WI) mittels eines 20x Eintauchobjektivs analysiert werden.

### 2.4.5 Messung

Zur Messung der PTG wurde eine Region zwischen zwei Knorpelspangen und die Fokusebene nahe der Zilien ausgewählt. Die Aufnahmen erfolgten bei Durchlicht mit

einer Kamera (Imago CCD), deren CCP-Chip eine Auflösung von 1280 x 960 Bildpunkten hatte. Zu jedem Messpunkt (siehe Protokolle) wurde ein Film mit 200 Bildern angefertigt. Die Belichtungszeit betrug 20 ms und zwischen zwei Aufnahmen lagen 85 ms, was einer Frequenz von 11,78 Bildern pro h entsprach.

#### 2.4.6 Versuche und Protokolle

Der Messbeginn wurde auf 30 min nach der Tiertötung und Organentnahme festgelegt. Bei jeder notierten Zeit wurde eine Messung durchgeführt. Es wurden jeweils 15 µl ACh- sowie jeweils 1,5 µl ATP-Lösung und Hepes zupipettiert. Von Eserin wurden je nach Versuchsreihe Volumina von 1,5 – 15 µl zugegeben.

##### ACh-Konzentrationsreihe

Zunächst wurde die PTG an AChE<sup>+/-</sup>, BuChE<sup>-/-</sup>-Mäusen und deren korrespondierenden WT ohne Substanzzugabe für 15 min gemessen. Durch die Zugabe von jeweils 15 µl ACh im Abstand von 10 min ergaben sich aufsteigend die Konzentrationen  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  sowie  $10^{-4}$  im Medium. Die Messungen erfolgten jeweils im Abstand von 5 min. Die abschließende ATP-Gabe mit einer Konzentration von  $10^{-4}$  M im Medium diente zur Vitalitätsprüfung der Trachea.

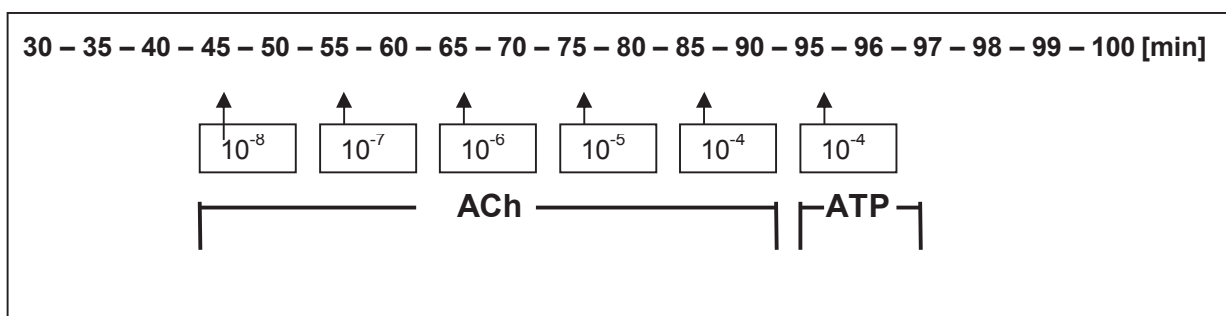


Abb. 3: Versuchsprotokoll der ACh-Konzentrationsreihe

### Eserinreihe

Eserin ist ein Inhibitor der AChE und BuChE (Johansson und Nordberg 1993). Für die Versuche wurden AChE<sup>+/-</sup>, BuChE<sup>-/-</sup>-Mäuse und deren korrespondierende Wildtypen verwendet. Zuerst wurden 4 Messungen ohne Substanzzugabe durchgeführt. Durch die Zugabe von jeweils 15 µl Eserin im Abstand von 10 min ergaben sich im Medium aufsteigend die Konzentrationen  $10^{-7}$  M,  $10^{-6}$  M und  $10^{-5}$  M. Die Messungen erfolgten im Abstand von 5 min. Die Vitalitätsüberprüfung der Trachea erfolgte mit einer Konzentration von  $10^{-4}$  M ATP im Medium.

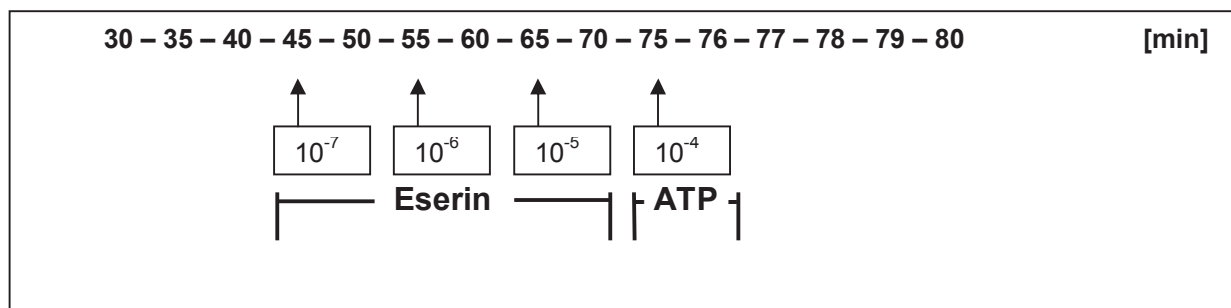


Abb. 4: Versuchsprotokoll der Eserinreihe

### Einfluss von Eserin auf den ACh-stimulierten Partikeltransport

Bei diesen Versuchen wurden AChE<sup>+/+</sup>-Mäuse ohne Substanzzugabe über die Dauer von 55 min gemessen. Die Zugabe von 1,5 µl Eserin ergab eine Konzentration von  $10^{-5}$  M im Medium. Nach zwei weiteren Messungen im Abstand von 5 min wurde durch die Zugabe von 15 µl ACh eine Konzentration  $10^{-6}$  M im Medium erzielt. Als Negativkontrolle wurde an Stelle von Eserin 1,5 µl Hepses zupipettiert.

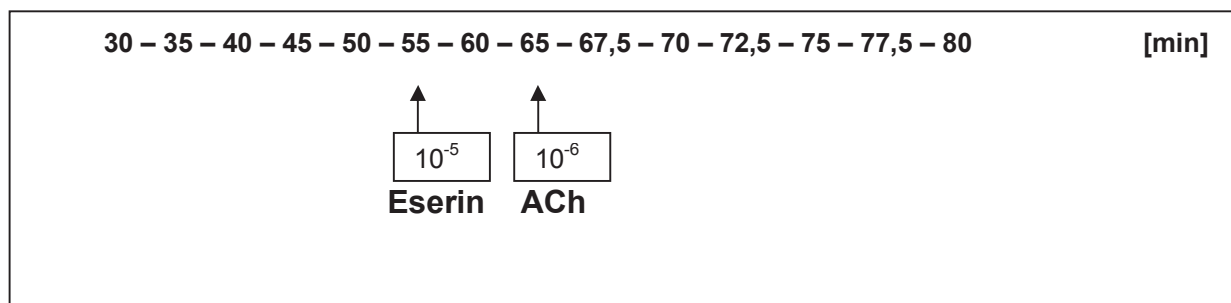


Abb. 5: Versuchsprotokoll des Einflusses von Eserin auf den ACh-stimulierten Partikeltransport

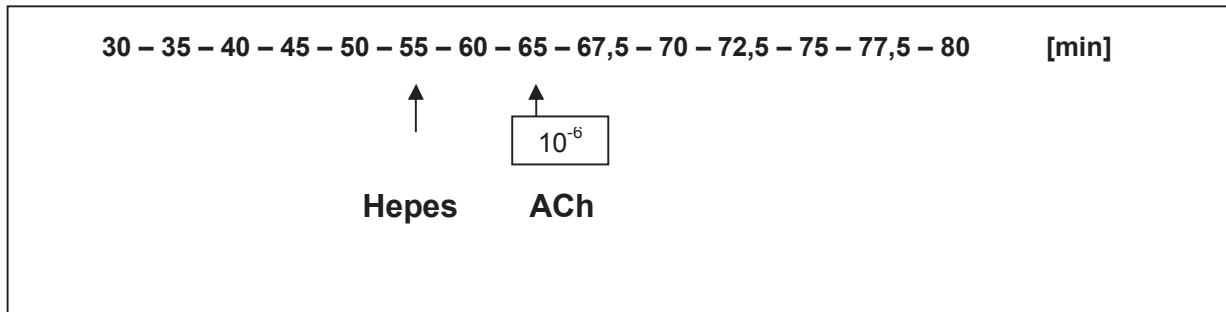


Abb. 6: Versuchsprotokoll der Negativkontrolle

### 2.4.7 Auswertung

Zur Berechnung der Durchschnittsgeschwindigkeit aller transportierten Partikel diente das Programm Tillvision, in dem zur Auswertung von allen Bildern eines Filmes ein Durchschnittsbild berechnet wurde. Die Originalbilder (12 Bit) wurden zur Kopie in 8 Bit umgerechnet. Um ein binäres Bild der Kopie zu erhalten, welches die sichtbaren Partikel weiß und den Hintergrund schwarz zeigte, musste der Schwellenwert zwischen 500 und 1000 gesetzt werden. Diese Bilder wurden ebenfalls auf 8 Bit umgerechnet. Für beide 8-Bit-Bilder wurde ein Tracking-Algorithmus mit einer maximalen Pixeldistanz von 50 Pixel und einer maximalen Beschleunigung von 20 pixel/frame<sup>2</sup> durchgeführt. Die maximale Pixeldistanz ist definiert als die Distanz, die ein Partikel in zwei aufeinander folgenden Bildern zurückgelegt hat, um in die Berechnung aufgenommen zu werden. Die maximale Beschleunigung beschreibt die Beschleunigung, die ein Partikel in zwei aufeinander folgenden Bildern aufweisen darf, um in die Berechnung aufgenommen zu werden. Zur Ermittlung der Mittel- und Medianwerte wurden pro Messpunkt nur die Partikel ausgewählt, die in 10 aufeinander folgenden Bildern sichtbar waren. Abschließend erfolgte die graphische Darstellung der Mittelwerte (MW) in einem Excel-Diagramm, welches die Zeit nach Organentnahme (min) der Durchschnittsgeschwindigkeit gegenüberstellt. Die Durchschnittsgeschwindigkeit wies programmspezifische Einheiten auf, die mit einem kalkulierten Faktor (für das 20iger Objektiv x 0,0073885) in  $\mu\text{m/s}$  umgerechnet wurden.

### 2.4.8 Ausschlusskriterien der Auswertung

Die Versuche, die mindestens eines der folgenden Kriterien aufwiesen, wurden nicht in die Ergebnisse einbezogen:

#### Kriterium 1

Geringer Partikeltransport (PT) und/oder langsame Anfangsgeschwindigkeit der Partikel mit Werten unter 50  $\mu\text{m/s}$ , bedingt durch Temperaturschwankungen während der Messung, durch nicht entferntes Fettgewebe und durch Beschädigung des Flimmerepithels bei der Organentnahme.

#### Kriterium 2

Kein Effekt bei der Vitalitätsüberprüfung mittels ATP-Gabe. Bei vorheriger Gabe von Eserin sollte der Anstieg nach ATP-Gabe um ca. 40-70  $\mu\text{m/s}$  erfolgen und nach vorheriger ACh-Gabe um ca. 10-20  $\mu\text{m/s}$ .

### 2.4.9 Statistik

Nach der explorativen Datenanalyse erfolgte bei verbundenen Stichproben der Wilcoxon-Test. Lagen unverbundene Paare zwischen verschiedenen Mausstämmen vor, wurden der Kruskal-Wallis-Test und der Mann-Whitney-Test durchgeführt. Als signifikant wurden Differenzen bei  $p < 0,05$  bezeichnet. Graphisch wurden die Ergebnisse in Form von Boxplots mit Minimum-, Maximum- und Medianwerten sowie den Perzentilen 25 und 75 dargestellt.

### 3 Ergebnisse

Die Graphiken stellen den MW der PTG aller transportierten Partikel (Reihe 1) und der gefilterten Partikel dar, bei denen die zurückgelegte Strecke zwischen Start- und Endpunkt der Messung nicht mehr als 15% vom direkten Weg abweicht (Reihe 2). In den Ergebnissen wurde bei Substanzzugabe die Endkonzentration im Medium angegeben. Als signifikant wurden Änderungen der PTG mit  $p \leq 0,05$  (Kruskal-Wallis- und Mann-Whitney-Test) gewertet.

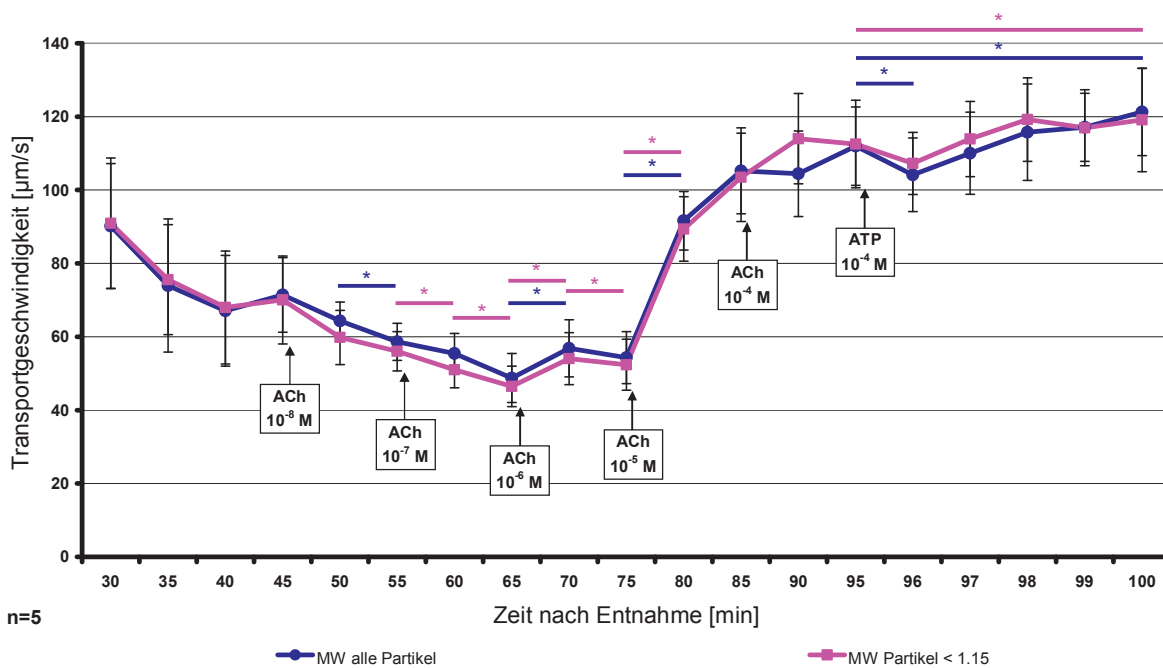
#### 3.1 Die Wirkung von ACh auf die PTG (ACh-Konzentrationsreihe)

Die Wirkung von ACh auf die PTG wurde an AChE<sup>+/-</sup>- und BuChE<sup>-/-</sup>-Mäusen sowie deren korrespondierenden WT mittels einer ACh-Konzentrationsreihe untersucht.

##### AChE<sup>+/+</sup>-Mäuse

Bei den AChE<sup>+/+</sup>-Mäusen zeigte Reihe 1 bei der Konzentration  $10^{-8}$  M ACh zwischen den Messpunkten 50 und 55 einen signifikanten Geschwindigkeitsabfall (Abb. 7). Bei Reihe 2 wurde eine signifikante Reduktion der PTG bei der Konzentration  $10^{-7}$  M ACh gemessen (Messpunkte 55 und 60 sowie 60 und 65). Die erste signifikante Erhöhung der PTG um im Mittel  $8 \mu\text{m/s}$  wurde für beide Reihen bei der Konzentration  $10^{-6}$  M ACh (Messpunkte 65 und 70) beobachtet. Nach einem signifikanten Abfall der PTG beider Reihen zwischen den Messpunkten 70 und 75 (auch Konzentration  $10^{-6}$  M) wurde ein erneuter signifikanter Anstieg der PTG beider Reihen um im Mittel  $37 \mu\text{m/s}$  bei der Konzentration  $10^{-5}$  M ACh (Messpunkte 75 und 80) beobachtet. Nach ATP-Zugabe (Konzentration  $10^{-4}$  M) wurde bei Reihe 1 zwischen den Messpunkten 95 und 96 ein signifikanter Abfall der PTG beobachtet, wobei zwischen Messpunkt 95 und dem Geschwindigkeitsmaximum (Messpunkt 100) eine signifikante Erhöhung um im Mittel  $9 \mu\text{m/s}$  erfolgte. Zwischen Messpunkt 95 und dem Geschwindigkeitsmaximum (Messpunkt 100) wurde für Reihe 2 ebenfalls ein signifikanter Anstieg um im Mittel  $7 \mu\text{m/s}$  nachgewiesen. ATP bewirkte bei beiden

Reihen einen signifikanten Anstieg der PTG, der über den bereits erfolgten Anstieg durch ACh-Stimulation hinausging.

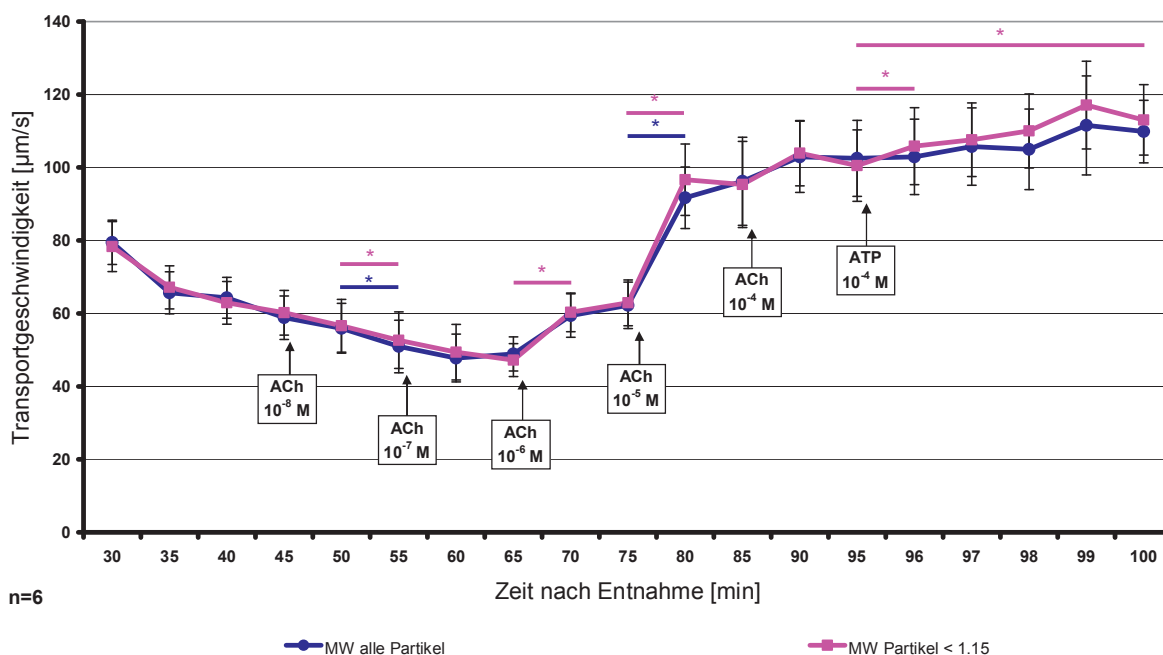


**Abb. 7:** AChE<sup>+/-</sup>-Mäuse: PTG nach Zugabe von ACh (Konzentrationsreihe). Dargestellt sind die MW der PTG mit dazugehörigem SEM. Die Kurve mit Kreissymbolen zeigt die Werte aller transportierten Partikel (**Reihe 1**). Die Partikel, bei denen die zurückgelegte Strecke zwischen Start- und Endpunkt der Messung nicht mehr als 15% vom direkten Weg abweicht, werden auf der Kurve mit viereckigen Symbolen dargestellt (**Reihe 2**). Signifikante Änderungen der PTG ( $p \leq 0,05$ ) werden durch Sterne verdeutlicht. Signifikante Reduktionen der PTG werden bei den Konzentrationen  $10^{-8}$  und  $10^{-7}$  M ACh im Medium beobachtet, wobei die Konzentrationen  $10^{-6}$  und  $10^{-5}$  M sowie die ATP-Gabe ( $10^{-4}$  M) signifikante Steigerungen der PTG ergeben.

### AChE<sup>+/-</sup>-Mäuse

Bei den AChE<sup>+/-</sup>-Mäusen zeigte sich für beide Reihen ein signifikanter Geschwindigkeitsabfall bei der Konzentration  $10^{-8}$  M ACh zwischen den Messpunkten 50 und 55 (Abb. 8). Für Reihe 2 wurde bei der Konzentration  $10^{-6}$  M ACh (Messpunkte 65 und 70) eine signifikante Erhöhung der PTG um im Mittel 11  $\mu\text{m/s}$  erfasst. Die Maximalwerte nach ACh-Stimulation, 103  $\mu\text{m/s}$  für Reihe 1 und 104  $\mu\text{m/s}$  für Reihe 2 wurden bei der Konzentration  $10^{-4}$  M ACh (Messpunkte 75-80) erreicht, in dem sich die PTG bei Reihe 1 um im Mittel 7  $\mu\text{m/s}$  und bei Reihe 2 um 9  $\mu\text{m/s}$  signifikant erhöhte. Die ATP-Stimulation (Konzentration  $10^{-4}$  M) zeigte ausschließlich bei Reihe 2 zwischen den Messpunkten 95 und 96 sowie 95 und dem

Maximalwert (Messpunkt 99) einen weiteren signifikanten Anstieg der Transportgeschwindigkeit um im Mittel 18  $\mu\text{m/s}$ .



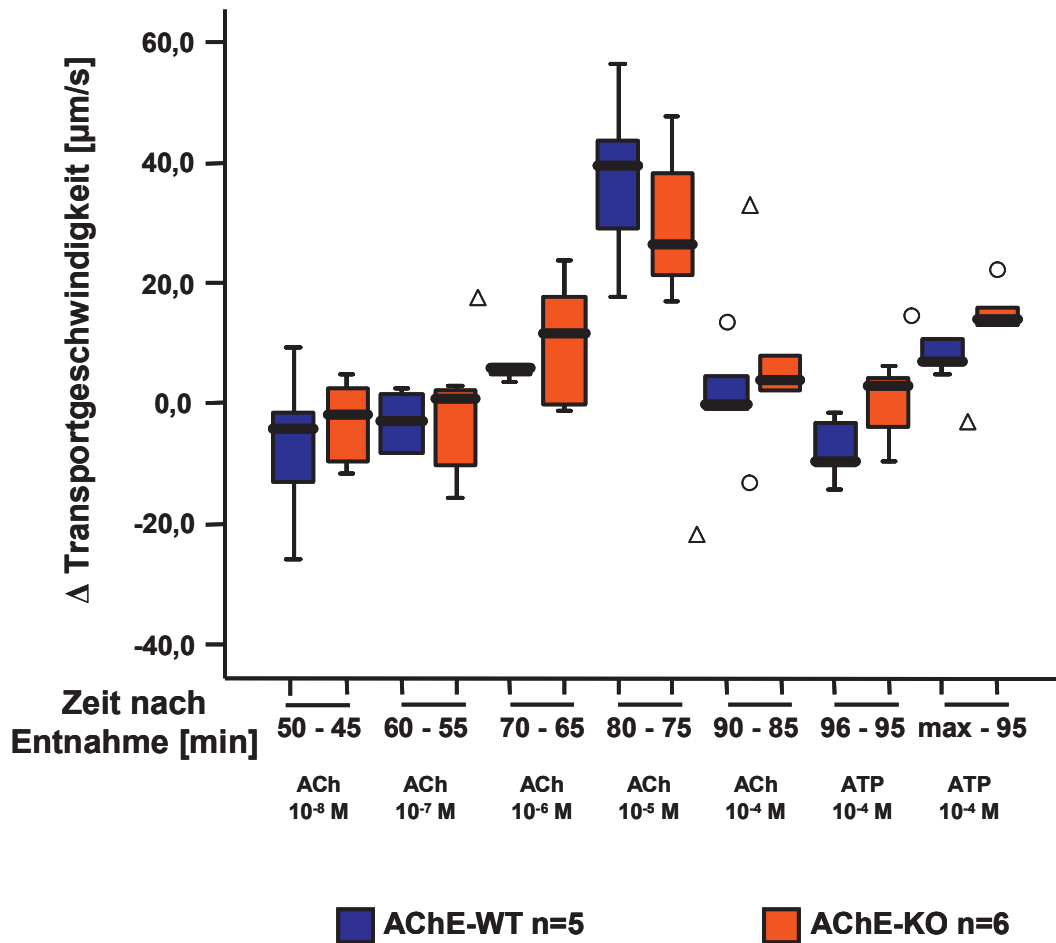
**Abb. 8:** AChE<sup>+/-</sup>-Mäuse: PTG nach Zugabe von ACh (Konzentrationsreihe). Dargestellt sind die MW der PTG mit dazugehörigem SEM. Die Kurve mit Kreissymbolen zeigt die Werte aller transportierten Partikel (**Reihe 1**). Die Partikel, bei denen die zurückgelegte Strecke zwischen Start- und Endpunkt der Messung nicht mehr als 15% vom direkten Weg abweicht, werden auf der Kurve mit viereckigen Symbolen dargestellt (**Reihe 2**). Signifikante Änderungen der PTG ( $p \leq 0,05$ ) werden durch Sterne markiert. Signifikante Reduktionen der PTG werden bei der Konzentration  $10^{-8}$  M im Medium beobachtet, wobei die Konzentrationen  $10^{-6}$  M,  $10^{-5}$  M sowie die ATP-Gabe ( $10^{-4}$  M) signifikante Steigerungen der PTG ergeben.

### Vergleich der PTG bei ACh-Konzentrationsreihe zwischen AChE<sup>+/-</sup>-Mäusen und deren korrespondierenden WT

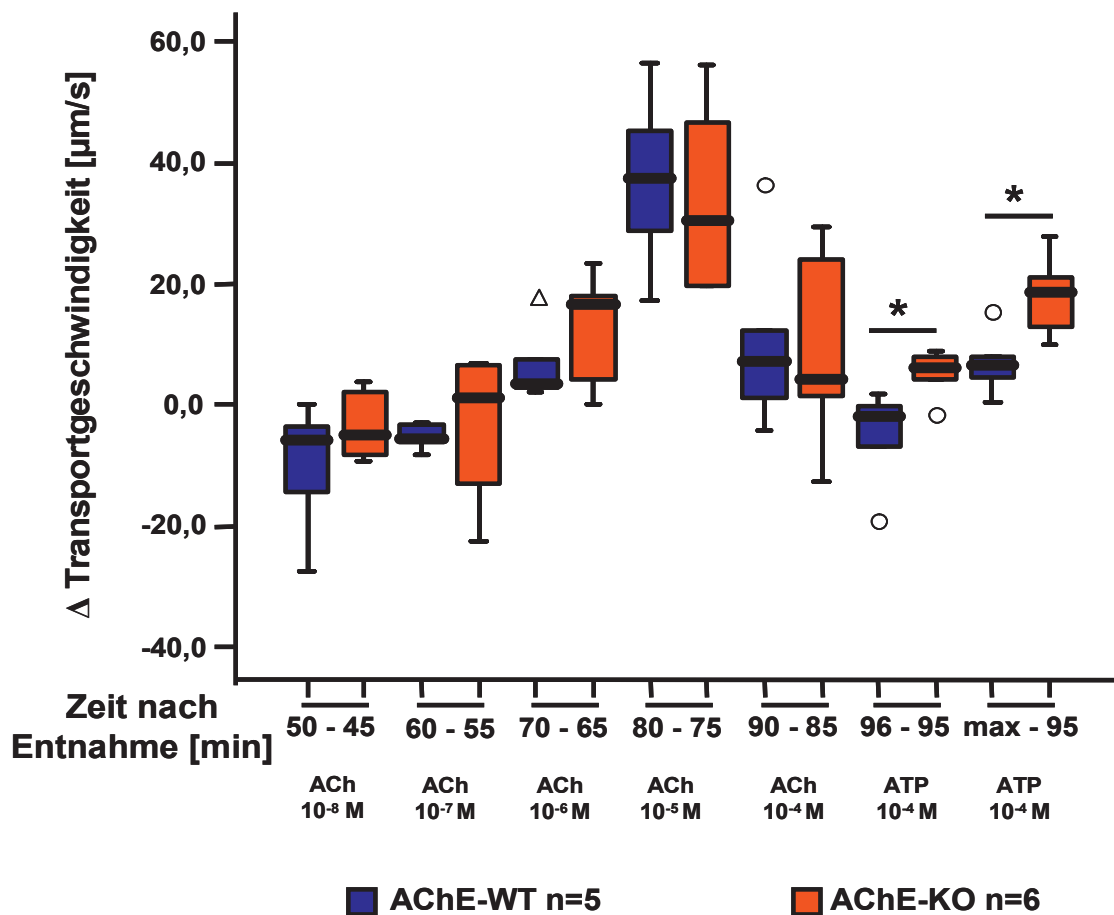
Für den statistischen Vergleich wurden die Differenzen der Messpunkte 50-45, 60-55, 70-65, 80-75, 90-85, 96-95 und Maximalgeschwindigkeit-95 von AChE<sup>+/-</sup>-Mäusen und deren korrespondierenden WT herangezogen. Beim Vergleich aller transportierten Partikel (Abb. 9) wurde über die gesamte Messdauer kein signifikanter Unterschied zwischen AChE<sup>+/-</sup>- und AChE<sup>+/+</sup>-Mäusen ermittelt. Allerdings zeigte sich zwischen den Messpunkten 95 und 96 nach ATP-Zugabe ( $10^{-4}$  M) ein tendenziell höherer Anstieg der PTG ( $p=0,052$ ) bei den AChE<sup>+/-</sup>-Mäusen. Ein signifikant höherer Anstieg der PTG bei den AChE<sup>+/-</sup>-Mäusen wurde hingegen für



die gefilterten Partikel (Abb. 10) zwischen Messpunkt 95 und 96 sowie zwischen 95 und dem Maximalwert nach ATP-Zugabe ( $10^{-4}$  M) nachgewiesen.



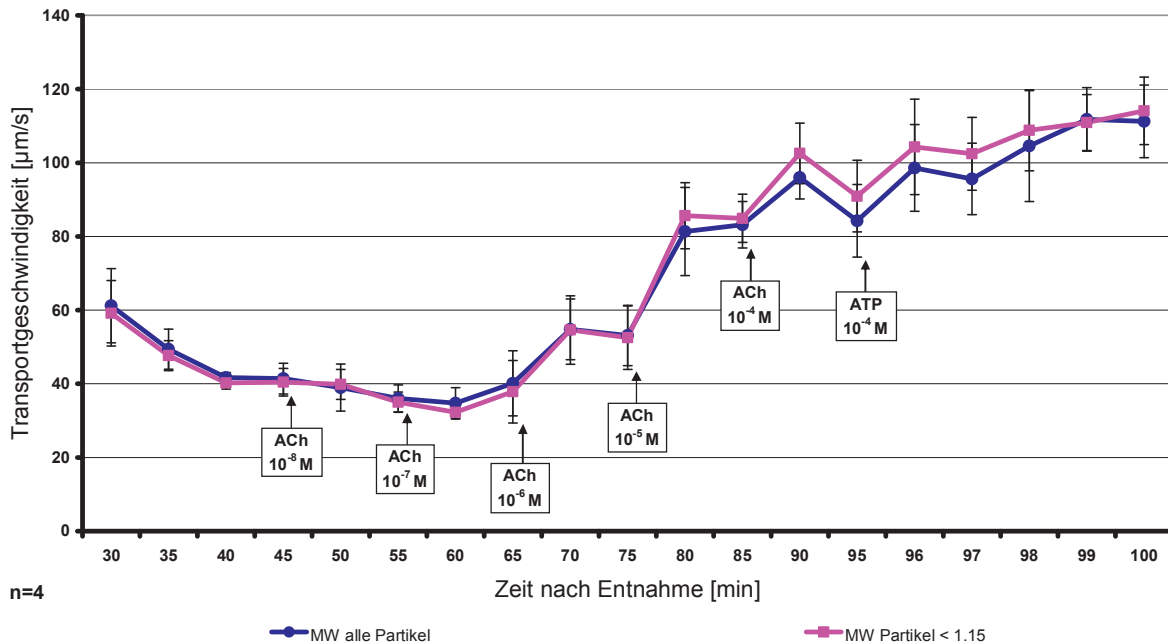
**Abb. 9: Reihe 1** (alle transportierten Partikel): Vergleich von AChE<sup>+/+</sup>- und AChE<sup>-/-</sup>-Mäusen (ACh-Konzentrationsreihe). Dargestellt sind die AChE<sup>+/+</sup>-Mäuse in blauen Boxplots und die AChE<sup>-/-</sup>-Mäuse in roten Boxplots. Die Boxplots sind mit Minimum, Maximum und Medianwerten sowie mit der 25 und 75 Perzentile dargestellt. Dreiecke und Kreise kennzeichnen Daten außerhalb der dreifachen Standardabweichung. Maximalwert der PTG = max. Die AChE<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigten nach ATP-Zugabe ( $10^{-4}$  M) zwischen den Messpunkten 95 und 96 einen tendenziellen Anstieg der PTG ( $p=0,052$ ).



**Abb. 10: Reihe 2** (gefilterte Partikel: Vergleich von AChE<sup>+/+</sup>-Mäusen und AChE<sup>-/-</sup>-Mäusen (ACh-Konzentrationsreihe). Dargestellt sind die AChE<sup>+/+</sup>-Mäuse in blauen Boxplots und die AChE<sup>-/-</sup>-Mäuse in roten Boxplots. Die Boxplots sind mit Minimum, Maximum und Medianwerten sowie mit der 25 und 75 Perzentile dargestellt. Dreiecke und Kreise kennzeichnen Daten außerhalb der dreifachen Standardabweichung. Signifikante Änderungen der PTG ( $p \leq 0,05$ ) werden durch Sterne markiert. Signifikante Anstiege der PTG werden nach ATP-Zugabe ( $10^{-4}$  M) zwischen den Messpunkten 95 und 96 sowie 95 und dem Maximalwert (max) nachgewiesen.

### BuChE<sup>+/+</sup>-Mäuse

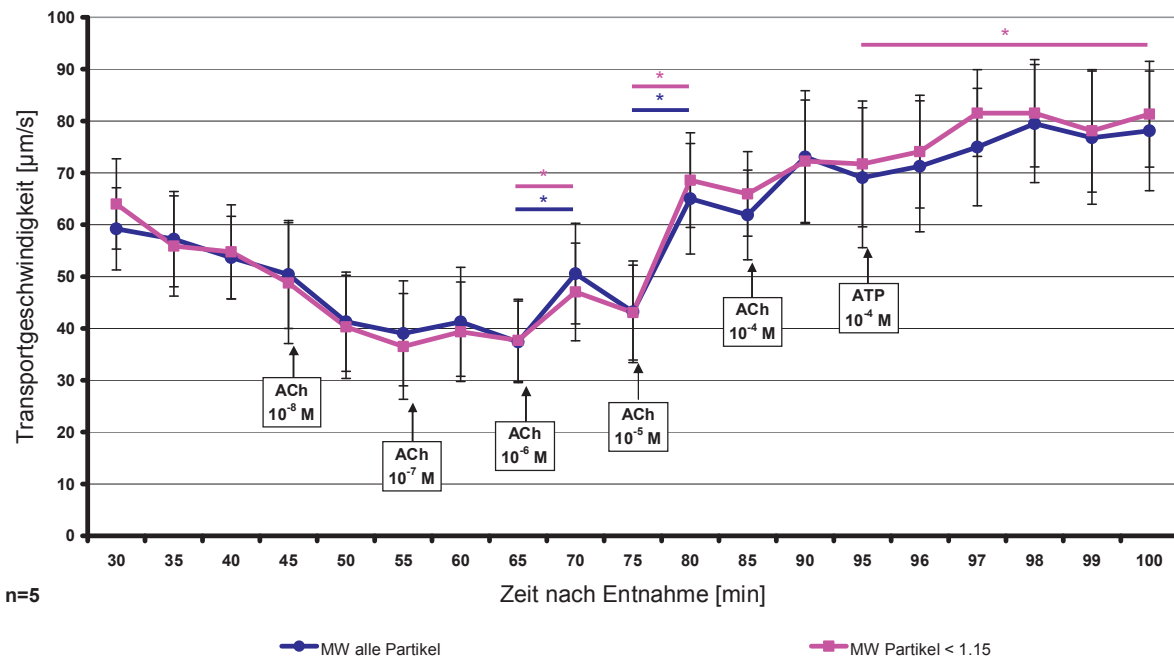
Bei den BuChE<sup>+/+</sup>-Mäusen wurde über die gesamte Messdauer bei beiden Reihen keine signifikante Veränderung der PTG beobachtet (Abb. 11). Bei den Konzentrationen  $10^{-6}$  M,  $10^{-5}$  M und  $10^{-4}$  M ACh im Medium sowie bei ATP-Stimulation ( $10^{-4}$  M) wurde für Reihe 1 ein tendenzieller Anstieg ( $p=0,068$ ) gemessen. Für Reihe 2 wurde ebenfalls ein tendenzieller Anstieg ( $p=0,068$ ) nach ATP-Stimulation zwischen Messpunkt 95 und dem maximalen Geschwindigkeitsanstieg nachgewiesen.



**Abb. 11:** BuChE<sup>+/+</sup>-Mäuse: PTG nach Zugabe von ACh (Konzentrationsreihe). Dargestellt sind die MW der PTG mit dazugehörigem SEM. Die Kurve mit Kreissymbolen zeigt die Werte aller transportierten Partikel (**Reihe 1**). Die Partikel, bei denen die zurückgelegte Strecke zwischen Start- und Endpunkt der Messung nicht mehr als 15% vom direkten Weg abweicht, werden auf der Kurve mit viereckigen Symbolen dargestellt (**Reihe 2**). Es wurden keine Änderungen der PTG gemessen.

### BuChE<sup>-/-</sup>-Mäuse

Bei diesem Mäusestamm wurde der erste signifikante Anstieg der PTG für beide Reihen bei  $10^{-6}$  M ACh zwischen den Messpunkten 65 und 70 gemessen (Abb. 12), wobei Reihe 1 um im Mittel  $13 \mu\text{m/s}$  und Reihe 2 um  $9 \mu\text{m/s}$  anstieg. Weiterhin wurde für Reihe 1 bei  $10^{-5}$  M ACh (Messpunkt 75 und 80) ein signifikanter Anstieg um im Mittel  $22 \mu\text{m/s}$  und Reihe 2 um  $26 \mu\text{m/s}$  nachgewiesen. Die ATP-Stimulation ( $10^{-4}$  M) konnte ausschließlich bei Reihe 2 zwischen Messpunkt 95 und dem Maximalwert (Messpunkt 98) eine erneute signifikante Steigerung der PTG um im Mittel  $13 \mu\text{m/s}$  auf eine Maximalgeschwindigkeit von  $82 \mu\text{m/s}$  erreichen.

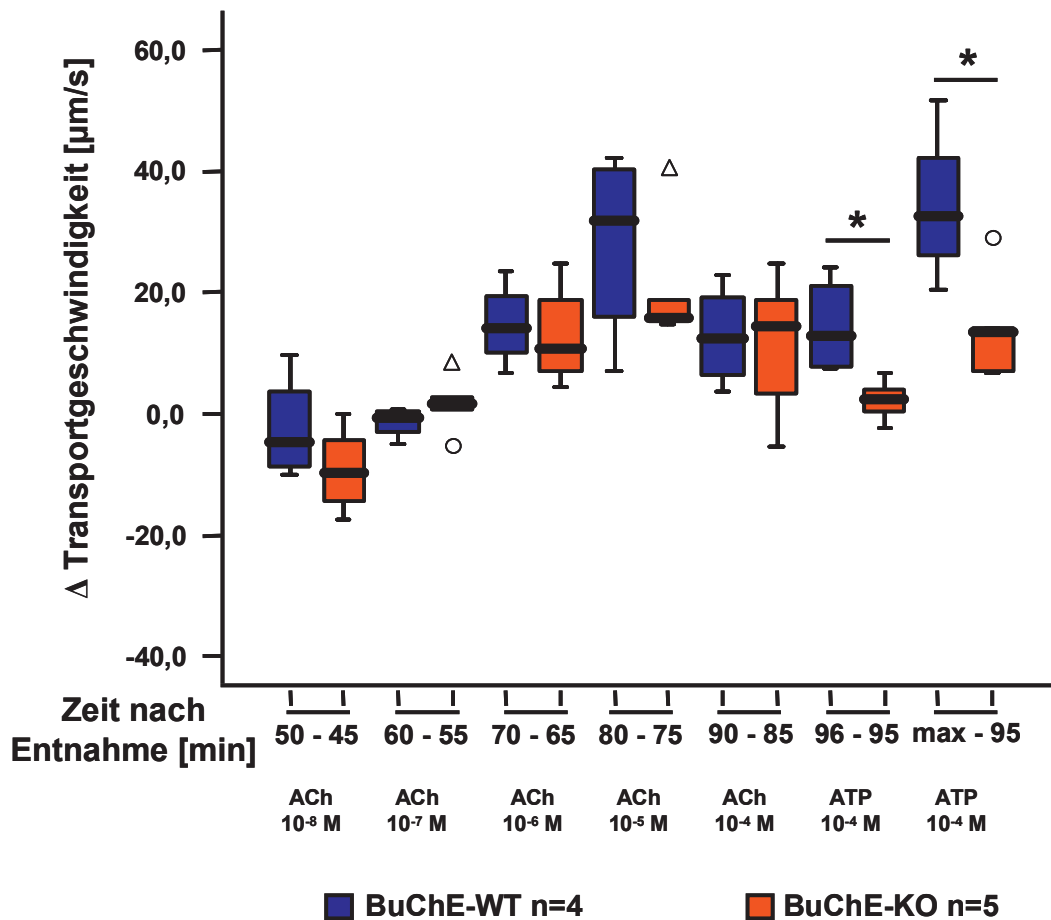


**Abb. 12:** BuChE<sup>-/-</sup>-Mäuse: PTG nach Zugabe von ACh (Konzentrationsreihe). Dargestellt sind die MW der PTG mit dazugehörigem SEM. Die Kurve mit Kreissymbolen zeigt die Werte aller transportierten Partikel (**Reihe 1**). Die Partikel, bei denen die zurückgelegte Strecke zwischen Start- und Endpunkt der Messung nicht mehr als 15% vom direkten Weg abweicht, werden auf der Kurve mit viereckigen Symbolen dargestellt (**Reihe 2**). Signifikante Änderungen der PTG ( $p \leq 0,05$ ) werden durch Sterne dargestellt. Signifikante Steigerungen der PTG werden bei den ACh-Konzentrationen  $10^{-5}$  M und  $10^{-5}$  M sowie nach ATP-Stimulation ( $10^{-4}$  M) gemessen.

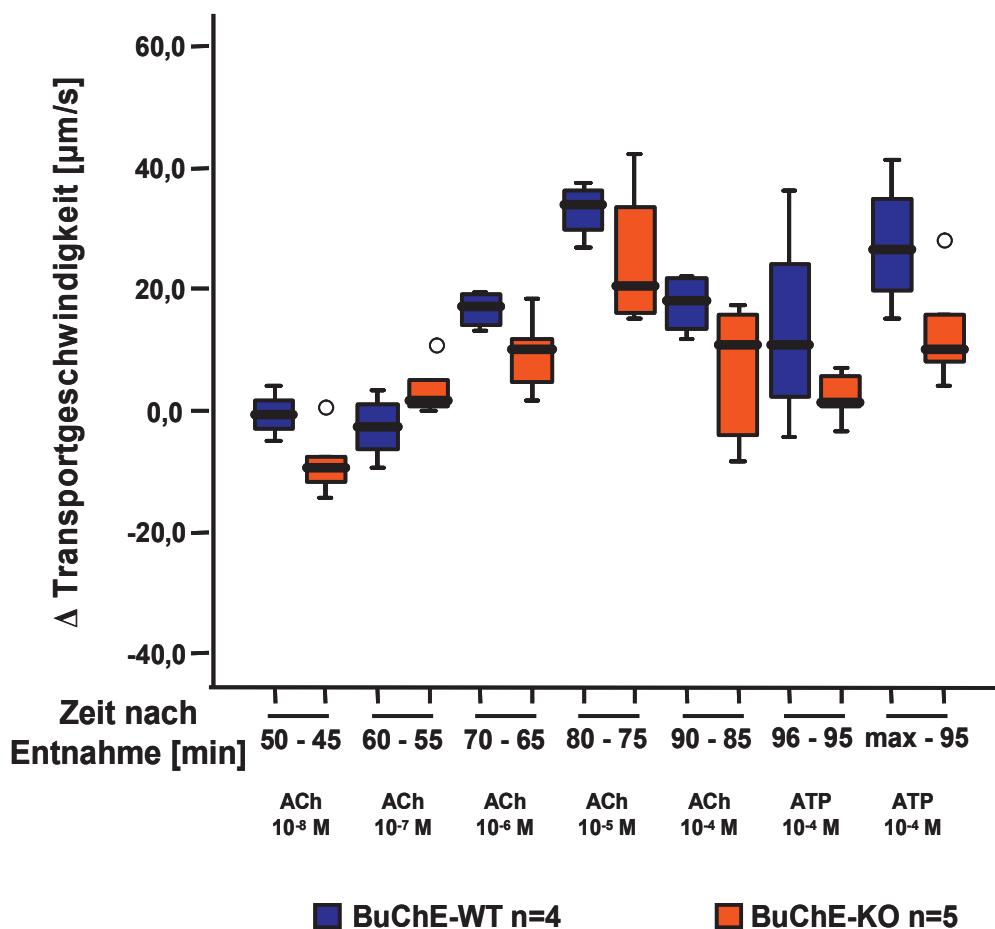
### Vergleich der PTG bei ACh-Konzentrationsreihe zwischen BuChE<sup>-/-</sup>-Mäusen und deren korrespondierenden WT

Für den statistischen Vergleich von BuChE<sup>-/-</sup>-Mäusen und deren korrespondierenden WT wurden die Differenzen zwischen den Messpunkten 50-45, 60-55, 70-65, 80-75, 90-85, 96-95 und Maximalgeschwindigkeit-95 verglichen. Eine signifikante Reduktion der PTG aller transportierter Partikel wurde bei den BuChE<sup>-/-</sup>-Mäusen in Relation zu den korrespondierenden WT nach ATP-Stimulation ( $10^{-4}$  M) zwischen Messpunkt 95 und 96 sowie zwischen Messpunkt 95 und dem Geschwindigkeitsmaximum beobachtet (Abb. 13). Keine Unterschiede wurden nach Stimulation mit ACh verzeichnet (Abb. 13). Bei den gefilterten Partikeln (Abb. 14) wurde weder nach ACh- noch nach ATP-Gabe ( $10^{-4}$  M) eine signifikante Regulation der PTG ermittelt. Eine

tendenzielle Reduktion ( $p=0,063$ ) der PTG bei den BuChE<sup>-/-</sup>-Mäusen konnte nach Gabe von  $10^{-6}$  M ACh (Messpunkt 65 und 70) beobachtet werden (Abb. 14).



**Abb. 13: Reihe 1** (alle transportierten Partikel): Vergleich von BuChE<sup>+/+</sup>-Mäusen und BuChE<sup>-/-</sup>-Mäusen (ACh-Konzentrationsreihe). Dargestellt sind die BuChE<sup>+/+</sup>-Mäuse in blauen Boxplots und die BuChE<sup>-/-</sup>-Mäuse in roten Boxplots. Die Boxplots sind mit Minimum, Maximum und Medianwerten sowie mit der 25 und 75 Perzentile dargestellt. Dreiecke und Kreise kennzeichnen Daten außerhalb der dreifachen Standardabweichung. Signifikante Änderungen der PTG ( $p \leq 0,05$ ) werden durch Sterne markiert. Bei den BuChE<sup>-/-</sup>-Mäusen wurde eine signifikante Reduktion der PTG nach ATP-Zugabe ( $10^{-4}$  M) zwischen den Messpunkten 95 und 96 sowie zwischen Messpunkt 95 und dem Maximalwert (max) gemessen.



**Abb. 14: Reihe 2** (gefilterte Partikel): Vergleich von BuChE<sup>+/+</sup>-Mäusen und BuChE<sup>-/-</sup>-Mäusen (ACh-Konzentrationsreihe). Dargestellt sind die BuChE<sup>+/+</sup>-Mäuse in blauen Boxplots und die BuChE<sup>-/-</sup>-Mäuse in roten Boxplots. Die Boxplots sind mit Minimum, Maximum und Medianwerten sowie mit der 25 und 75 Perzentile dargestellt. Dreiecke und Kreise kennzeichnen Daten außerhalb der dreifachen Standardabweichung. Maximalwert der PTG = max. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den BuChE<sup>-/-</sup>-Mäusen und ihren korrespondierenden WT beobachtet.

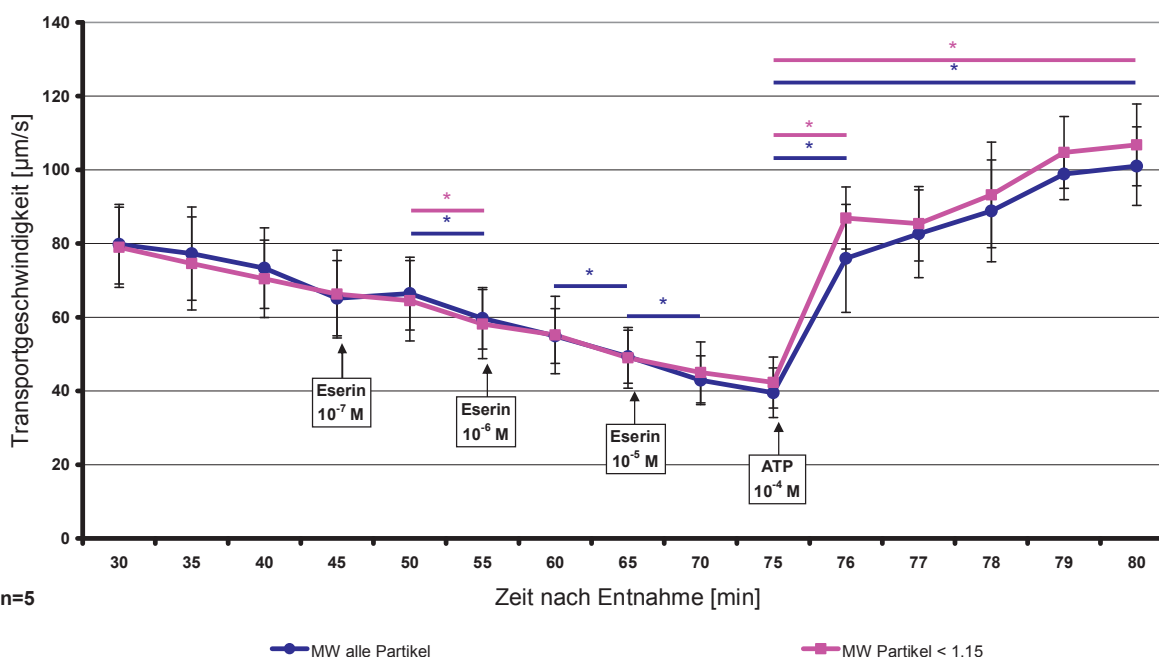
### 3.2 Die Wirkung von Eserin auf die PTG

Die Wirkung von Eserin auf die PTG wurde an AChE<sup>+/-</sup>- und BuChE<sup>-/-</sup>-Mäusen sowie deren korrespondierenden WT mittels einer Eserin-Konzentrationsreihe untersucht.

#### AChE<sup>+/+</sup>-Mäuse

Bei den AChE<sup>+/+</sup>-Mäusen wurde zwischen den Messpunkten 50 und 55 ein signifikanter Geschwindigkeitsabfall beider Reihen beobachtet (Eserin 10<sup>-7</sup> M) (Abb. 15). Im Gegensatz zu Reihe 2 wurde für Reihe 1 zwischen den Messpunkten

60 und 65 (Eserin  $10^{-6}$  M) eine signifikante Senkung der PTG gemessen. Die PTG bei Reihe 1 senkte sich erneut zwischen den Messpunkten 65 und 70 signifikant um im Mittel  $6 \mu\text{m/s}$  (Eserin  $10^{-5}$  M). Nach ATP-Stimulation ( $10^{-4}$  M) wurde eine signifikante Steigerung der PTG beider Reihen (Reihe 1 um  $63 \mu\text{m/s}$ , Reihe 2 um  $65 \mu\text{m/s}$ ) auf einen Maximalwert (Messpunkt 80) von  $79 \mu\text{m/s}$  (Reihe 1) und von  $82 \mu\text{m/s}$  (Reihe 2) beobachtet.

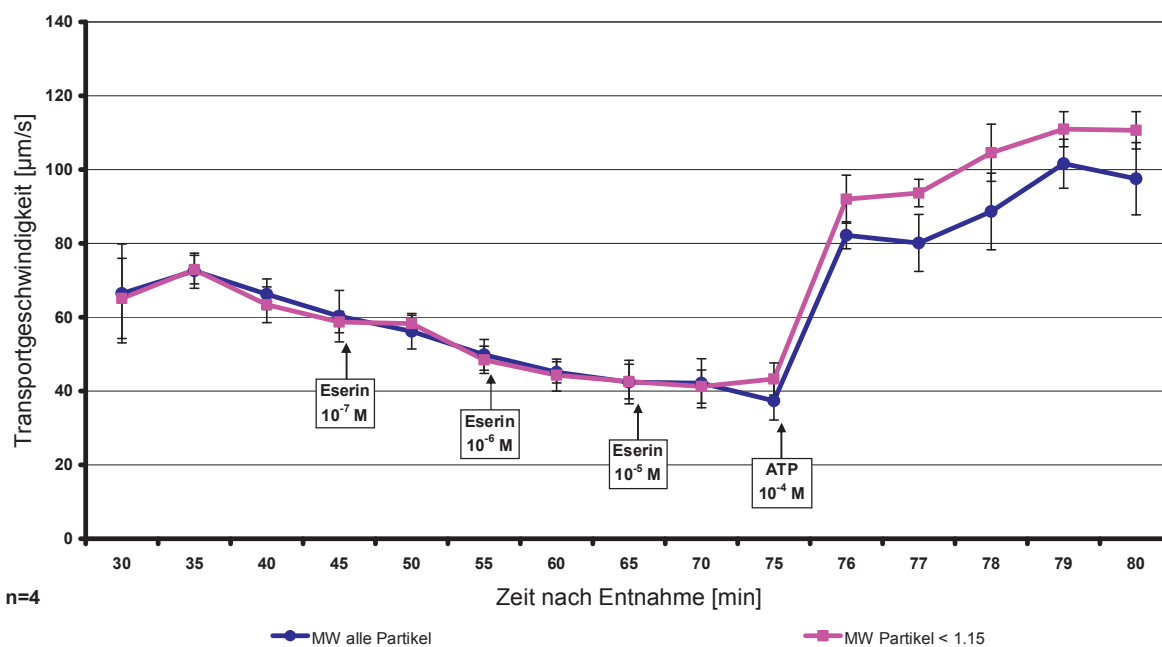


**Abb. 15:** AChE<sup>+/+</sup>-Mäuse: PTG nach Zugabe von Eserin. Dargestellt sind die MW der PTG mit dazugehörigem SEM. Die Kurve mit Kreissymbolen zeigt die Werte aller transportierten Partikel (**Reihe 1**). Die Partikel, bei denen die zurückgelegte Strecke zwischen Start- und Endpunkt der Messung nicht mehr als 15% vom direkten Weg abweicht, werden auf der Kurve mit viereckigen Symbolen dargestellt (**Reihe 2**). Signifikante Änderungen der PTG ( $p \leq 0,05$ ) werden durch Sterne gekennzeichnet. Signifikante Reduktionen der PTG wurden bei den Konzentrationen  $10^{-7}$  M,  $10^{-6}$  M und  $10^{-5}$  M im Medium beobachtet, wobei durch die ATP-Stimulation ( $10^{-4}$  M) signifikante Steigerungen der PTG erreicht wurden.

### AChE<sup>+/-</sup>-Mäuse

Bei den AChE<sup>+/-</sup>-Mäusen wurden für beide Reihen während der gesamten Versuchsdauer keine signifikanten Veränderungen der PTG gemessen (Abb. 16). Tendenzielle Reduktionen ( $p=0,068$ ) der PTG zeigten sich für Reihe 1 bei  $10^{-7}$  M Eserin zwischen Messpunkt 50 und 55 und tendenzielle Anstiege (jeweils  $p=0,068$ ) der PTG nach ATP-Stimulation ( $10^{-4}$  M) zwischen Messpunkt 75 und 76 sowie

zwischen Messpunkt 75 und der Maximalgeschwindigkeit (Messpunkt 79). Die Eserin-Zugabe  $10^{-7}$  M (Messpunkt 50 und 55),  $10^{-6}$  M (Messpunkt 55 und 60) und  $10^{-5}$  M (Messpunkt 70 und 75) bewirkte bei Reihe 2 tendenzielle Steigerungen (jeweils  $p=0,068$ ) der PTG. Hingegen wurde nach ATP-Gabe (Messpunkte 75 und 76 sowie 75 und Maximalgeschwindigkeit) eine tendenzielle Steigerungen der PTG ( $p=0,068$ ) gemessen.



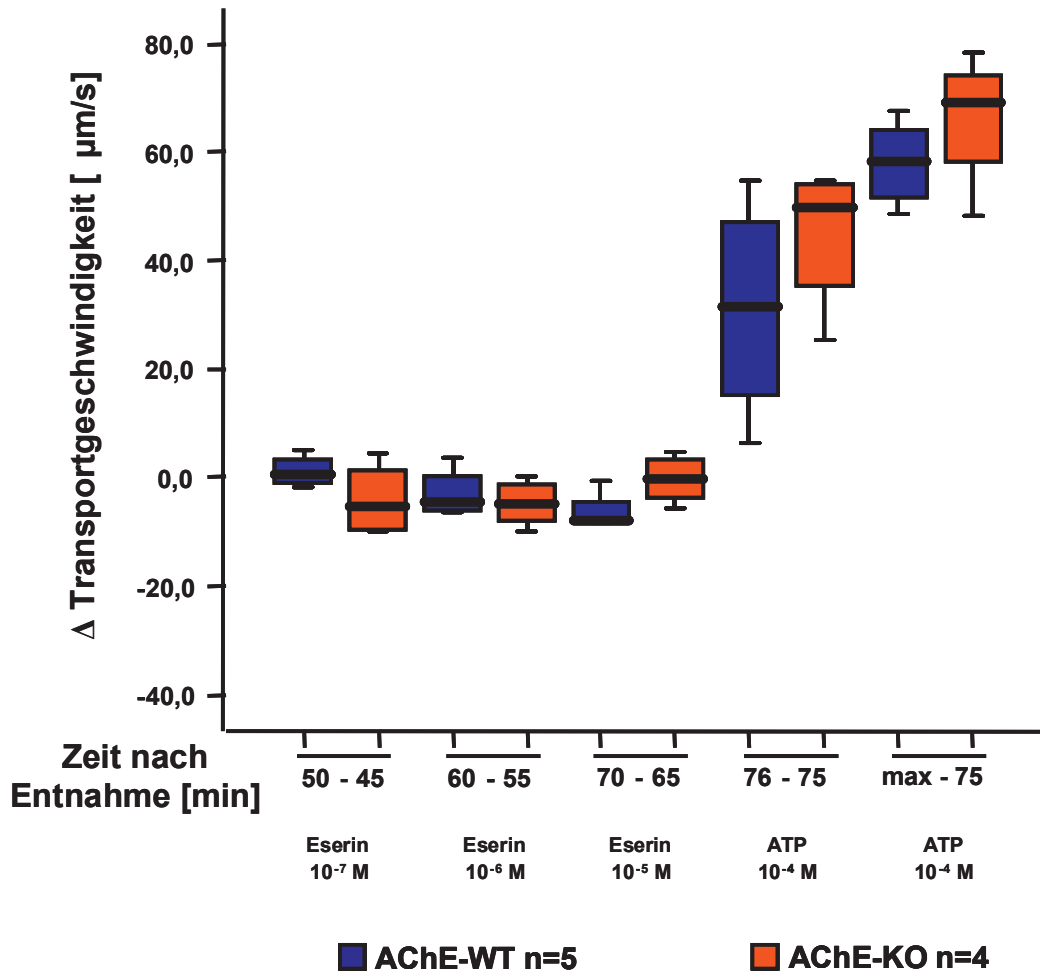
**Abb. 16:** AChE<sup>+/-</sup>-Mäuse: PTG nach Zugabe von Eserin. Dargestellt sind die MW der PTG mit dazugehörigem SEM. Die Kurve mit Kreissymbolen zeigt die Werte aller transportierten Partikel (**Reihe 1**). Die Partikel, bei denen die zurückgelegte Strecke zwischen Start- und Endpunkt der Messung nicht mehr als 15% vom direkten Weg abweicht, werden auf der Kurve mit viereckigen Symbolen dargestellt (**Reihe 2**). Es wurden keine signifikanten Änderungen der PTG beobachtet.

### Vergleich zwischen AChE<sup>+/-</sup>- und AChE<sup>+/+</sup>-Mäusen

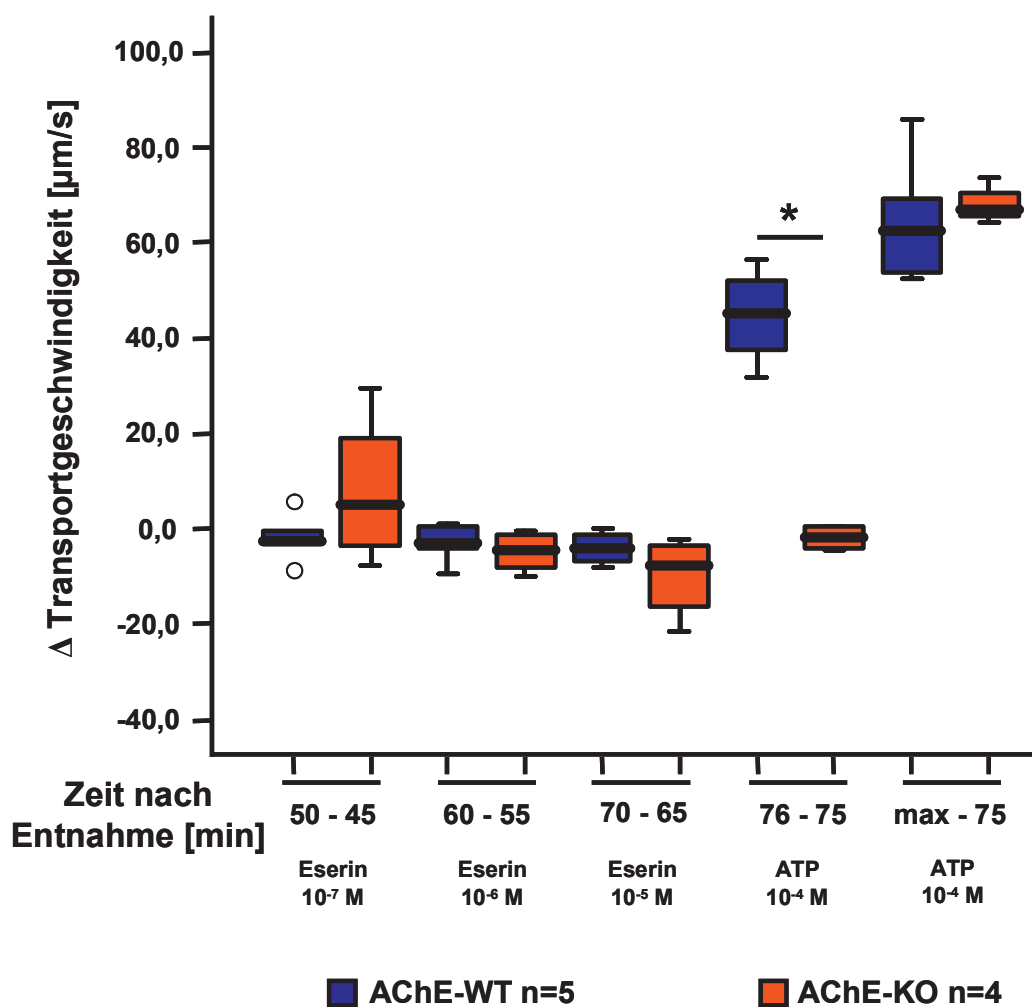
Für den statistischen Vergleich von AChE<sup>+/-</sup>-Mäusen und ihren korrespondierenden WT wurde die Differenz zwischen den Messpunkten 50-45, 60-55, 70-65, 80-75, 76-75 und Maximalgeschwindigkeit-75 verwendet. Für alle transportierten Partikel (Abb. 17) wurde keine signifikant differente Regulation der PTG bei den AChE<sup>+/-</sup>-Mäusen festgestellt. Hingegen wurde für die gefilterten Partikel (Abb. 18) der



AChE<sup>+/-</sup>-Mäuse ein signifikanter Anstieg der PTG nach ATP-Stimulation ( $10^{-4}$  M) zwischen den Messpunkten 75 und 76 ermittelt.



**Abb. 17: Reihe 1** (alle transportierten Partikel): Vergleich von AChE<sup>+/-</sup>-Mäusen und AChE<sup>-/-</sup>-Mäusen. Dargestellt sind die AChE<sup>+/-</sup>-Mäuse in blauen Boxplots und die AChE<sup>-/-</sup>-Mäuse in roten Boxplots. Die Boxplots sind mit Minimum, Maximum und Medianwerten sowie mit der 25 und 75 Perzentile dargestellt. Dreiecke und Kreise kennzeichnen Daten außerhalb der dreifachen Standardabweichung. Maximalwert der PTG = max. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen AChE<sup>+/-</sup>-Mäusen und AChE<sup>-/-</sup>-Mäusen beobachtet.

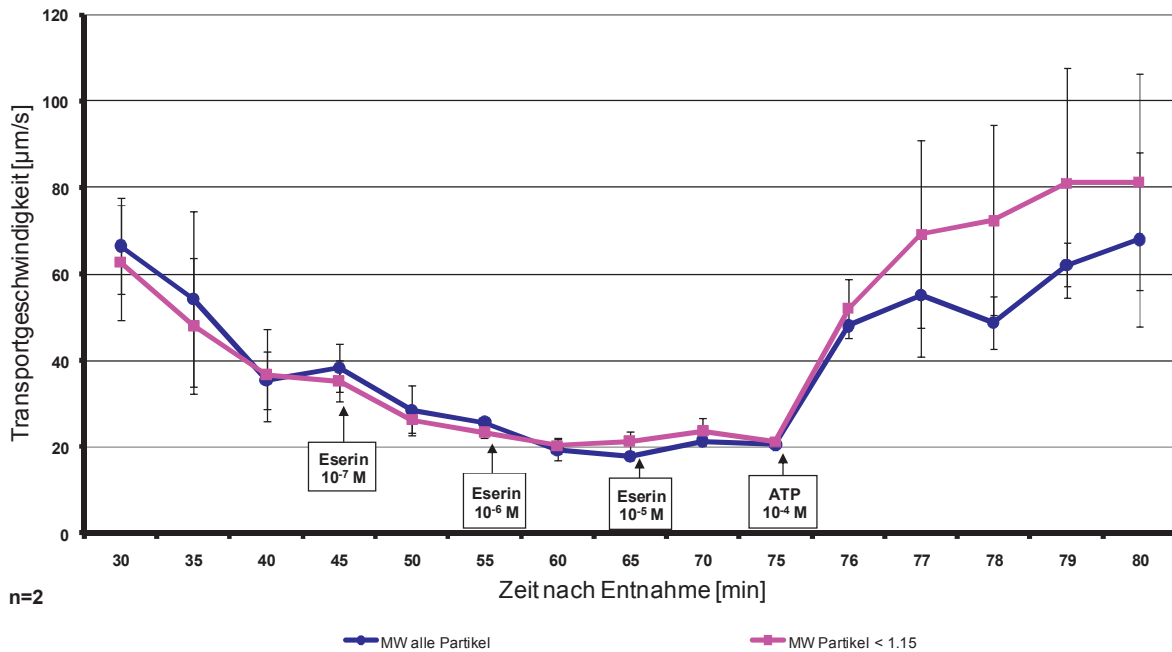


**Abb. 18: Reihe 2** (gefilterten Partikel): Vergleich von AChE<sup>+/+</sup>-Mäusen und AChE<sup>-/-</sup>-Mäusen. Dargestellt sind die AChE<sup>+/+</sup>-Mäuse in blauen Boxplots und die AChE<sup>-/-</sup>-Mäuse in roten Boxplots. Die Boxplots sind mit Minimum, Maximum und Medianwerten sowie mit der 25 und 75 Perzentile dargestellt. Dreiecke und Kreise kennzeichnen Daten außerhalb der dreifachen Standardabweichung. Maximalwert der PTG = max. Signifikante Änderungen der PTG ( $p \leq 0,05$ ) werden mit Sternen markiert. Bei den AChE<sup>-/-</sup>-Mäusen wurde nach ATP-Stimulation ( $10^{-4}$  M) eine signifikante Reduktion der PTG nachgewiesen.

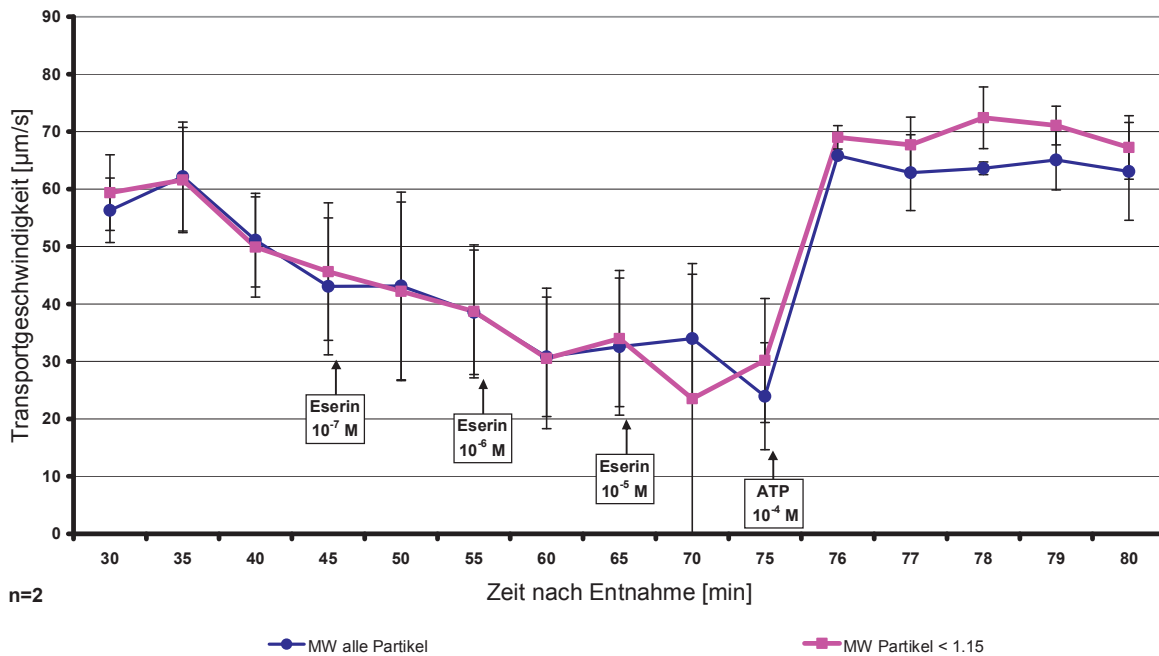
### BuChE<sup>+/+</sup>-Mäuse und BuChE<sup>-/-</sup>-Mäuse

Bei den BuChE<sup>-/-</sup>-Mäusen und ihren korrespondierenden WT wurden innerhalb der Eserinreihe jeweils nur 2 Mäuse untersucht, da in diesen ersten 4 Versuchen ebenfalls nicht einmal ein tendenzieller Hinweis auf eine PTG-steigernde Wirkung von Eserin beobachtet werden konnte (Abb. 19 und 20). Aufgrund der geringen Anzahl der untersuchten Mäuse wurden, wie erwartet, für alle transportierten Partikel sowie für die gefilterten Partikel keine signifikanten Unterschiede zwischen BuChE<sup>+/+</sup>-Mäusen und BuChE<sup>-/-</sup>-Mäusen beobachtet. In beiden Mäusestämmen wurden bei

einer Konzentration von  $10^{-7}$  M Eserin tendenzielle Reduktionen der PTG beider Reihen beobachtet. Nach ATP-Stimulation ( $10^{-4}$  M) zeigte sich ein tendenzieller ( $p = 0,065$ ) Anstieg für alle transportierten Partikel sowie für die gefilterten Partikel bei den BuChE<sup>-/-</sup>-Mäusen und dem korrespondierenden WT.



**Abb. 19:** BuChE<sup>+/+</sup>-Mäuse: PTG nach Zugabe von Eserin. Dargestellt sind die MW der PTG mit dazugehörigem SEM. Die Kurve mit Kreissymbolen zeigt die Werte aller transportierten Partikel (**Reihe 1**). Die Partikel, bei denen die zurückgelegte Strecke zwischen Start- und Endpunkt der Messung nicht mehr als 15% vom direkten Weg abweicht, werden auf der Kurve mit viereckigen Symbolen dargestellt (**Reihe 2**). Wie bei  $n=2$  nicht anders zu erwarten, wurden keine signifikanten Änderungen der PTG beobachtet.

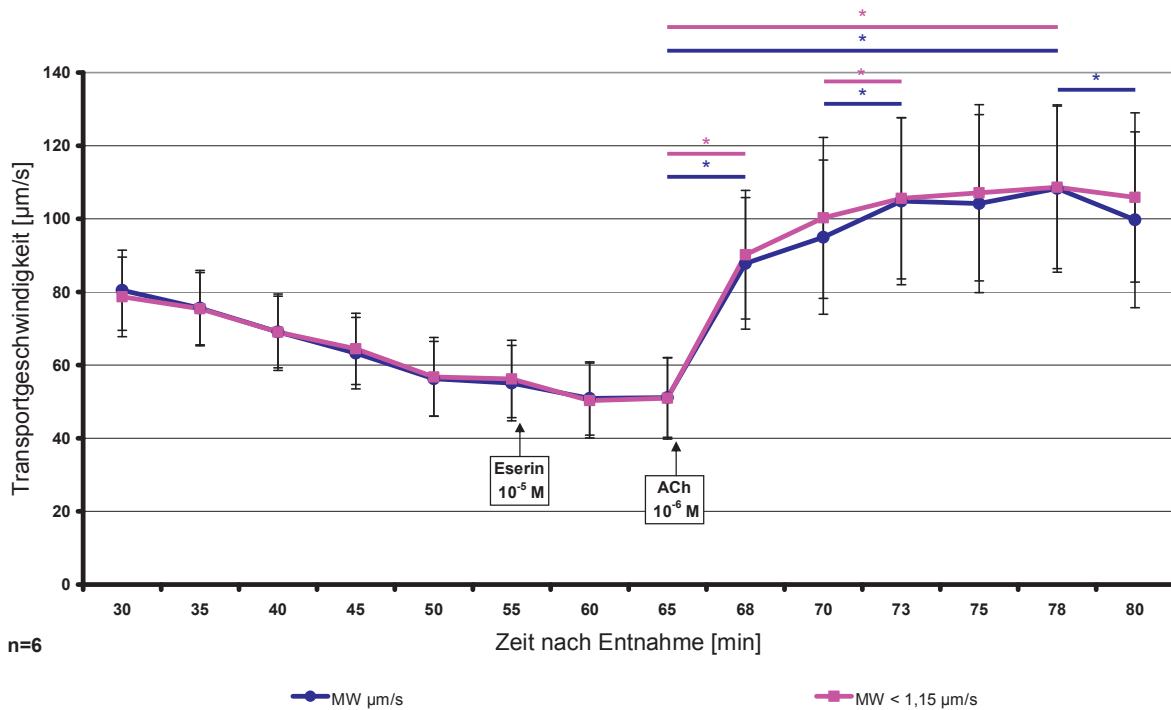


**Abb. 20:** BuChE<sup>+/-</sup>-Mäuse: PTG nach Zugabe von Eserin. Dargestellt sind die MW der PTG mit dazugehörigem SEM. Die Kurve mit Kreissymbolen zeigt die Werte aller transportierten Partikel (**Reihe 1**). Die Partikel, bei denen die zurückgelegte Strecke zwischen Start- und Endpunkt der Messung nicht mehr als 15% vom direkten Weg abweicht, werden auf der Kurve mit viereckigen Symbolen dargestellt (**Reihe 2**). Wie bei n=2 nicht anders zu erwarten, wurden keine signifikanten Änderungen der PTG beobachtet.

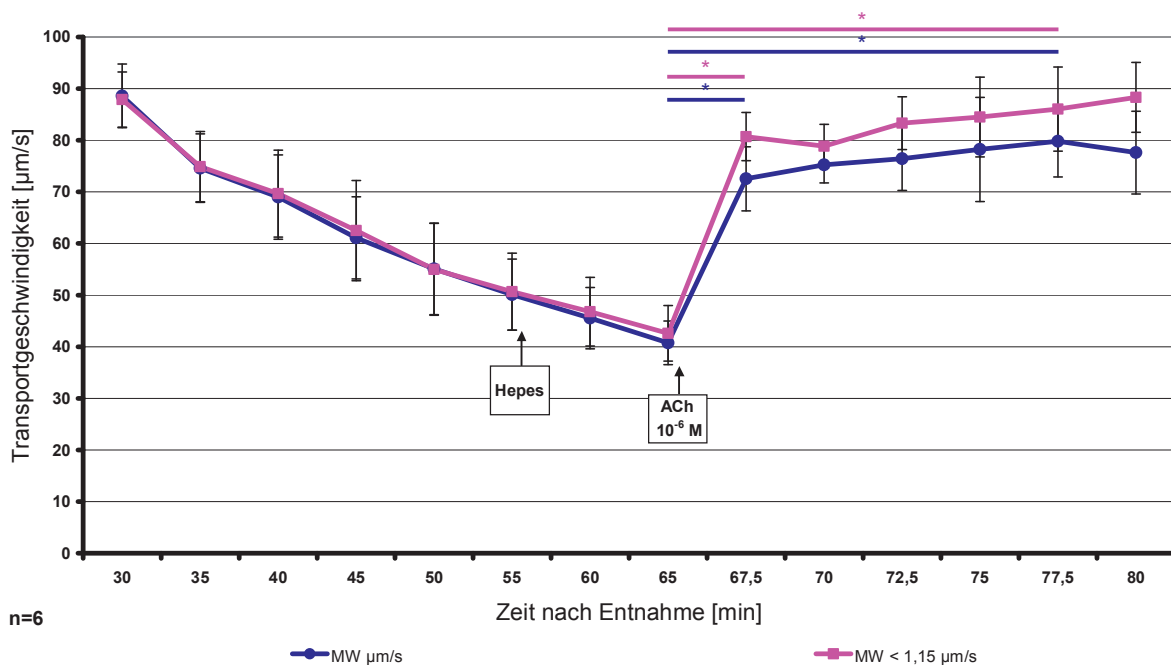
### 3.3 Die Wirkung von Eserin auf die ACh-stimulierte PTG

Bei diesem Versuchsansatz wurde die Wirkung von Eserin ( $10^{-5}$  M) auf die durch ACh ( $10^{-6}$  M) stimulierte PTG untersucht (Abb. 21). Diese Versuchsreihe wurde ausschließlich an AChE<sup>+/+</sup>-Mäusen durchgeführt. Es wurde ein signifikanter Anstieg der PTG für beide Reihen nach ACh-Zugabe ( $10^{-6}$  M) zwischen den Messpunkten 65 und 67,5 sowie zwischen den Messpunkten 70 und 72,5 beobachtet. Weiterhin zeigten beide Reihen zwischen den Messpunkten 65 und dem Maximalwert nach ACh-Gabe (Messpunkt 77,5) einen signifikanten Anstieg der PTG. Die PTG bei Reihe 1 stieg zusätzlich zwischen den Messpunkten 77,5 und 80 signifikant an. Es wurde in der Negativkontrolle, bei der statt Eserin das gleiche Volumen Hapes gegeben wurde (Abb. 22), eine signifikante Steigerung der PTG zwischen den Messpunkten 65 und 67,5 und nach ACh-Gabe ( $10^{-6}$  M) zwischen den Messpunkten

65 und 67,5 sowie zwischen Messpunkt 65 und dem Geschwindigkeitsmaximum (Messpunkt 77,5) beobachtet.



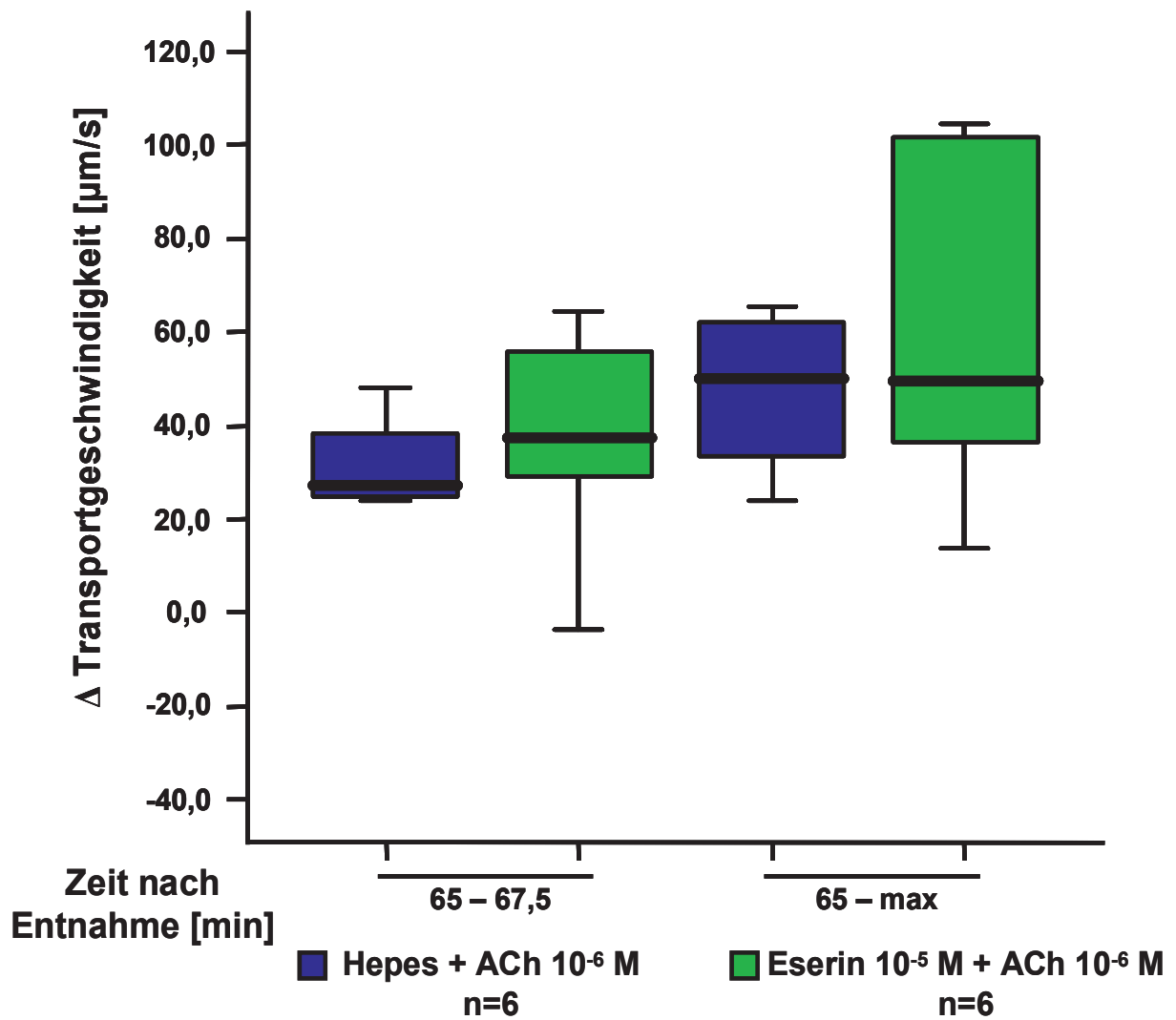
**Abb. 21:** AChE<sup>+/+</sup>-Mäuse: Wirkung von Eserin auf die ACh-stimulierte PTG. Dargestellt sind die MW der PTG mit dazugehörigem SEM. Die Kurve mit Kreissymbolen zeigt die Werte aller transportierten Partikel (**Reihe 1**). Die Partikel, bei denen die zurückgelegte Strecke zwischen Start- und Endpunkt der Messung nicht mehr als 15% vom direkten Weg abweicht, werden auf der Kurve mit viereckigen Symbolen dargestellt (**Reihe 2**). Signifikante Änderungen der PTG ( $p \leq 0,05$ ) werden mit Sternen gekennzeichnet. Nach ACh-Gabe ( $10^{-6}$  M) wurden signifikante Anstiege der PTG zwischen den Messpunkten 65 und 67,5, 70 und 72,5, 77,5 und 80 sowie zwischen Messpunkt 65 und der Maximalgeschwindigkeit beobachtet.



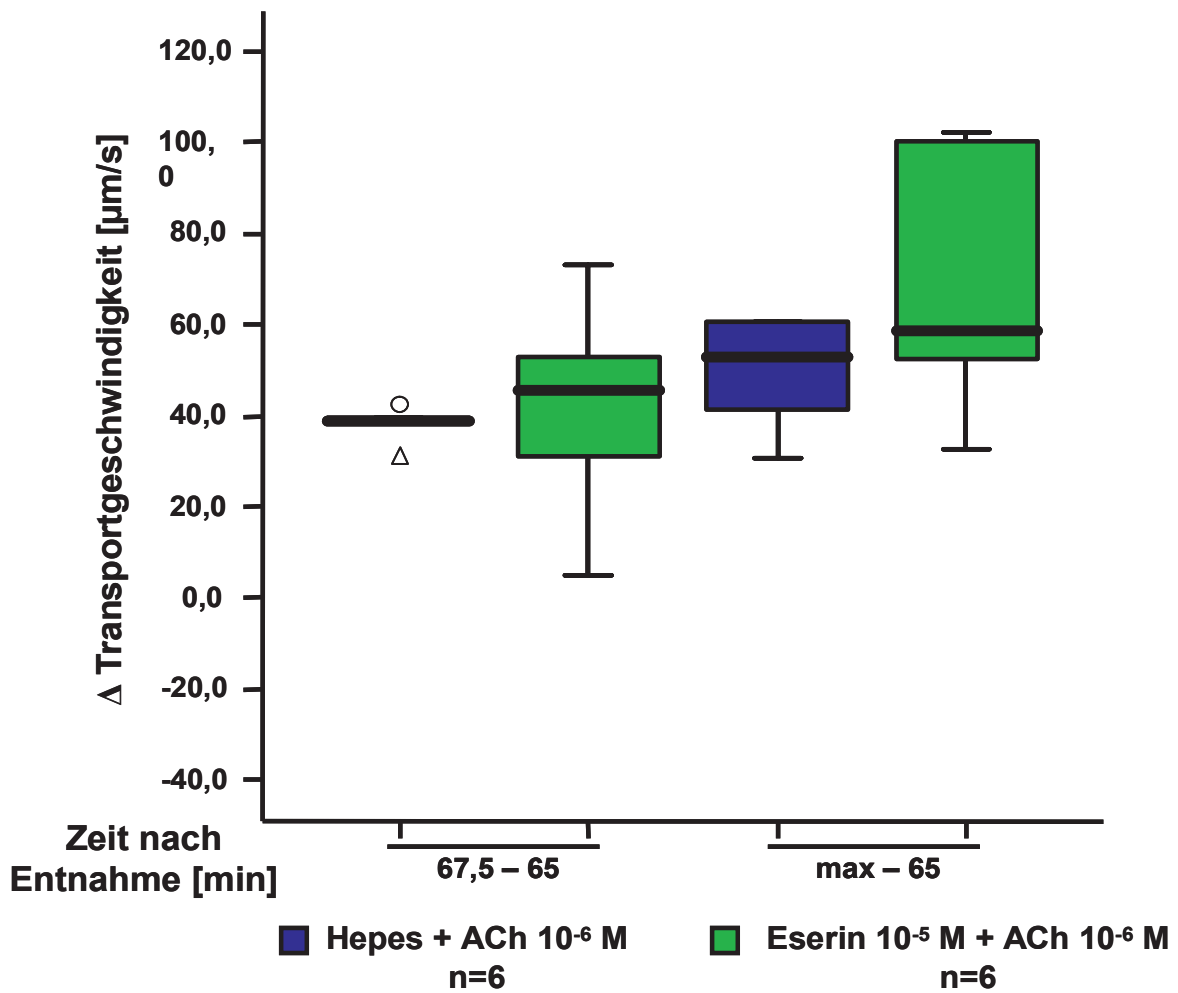
**Abb. 22:** AChE<sup>+/+</sup>-Mäuse: Negativkontrolle zur Wirkung von Eserin auf die ACh-stimulierte PTG an AChE-WT-Mäusen. Dargestellt sind die MW der PTG mit dazugehörigem SEM. Die Kurve mit Kreissymbolen zeigt die Werte aller transportierten Partikel (**Reihe 1**). Die Partikel, bei denen die zurückgelegte Strecke zwischen Start- und Endpunkt der Messung nicht mehr als 15% vom direkten Weg abweicht, werden auf der Kurve mit viereckigen Symbolen dargestellt (**Reihe 2**). Signifikante Änderungen der PTG ( $p \leq 0,05$ ) werden mit Sternen gekennzeichnet. Nach ACh-Gabe ( $10^{-6}$  M) wurden signifikante Steigerungen der PTG zwischen den Messpunkten 65 und 67,5, 70 sowie zwischen Messpunkt 65 und der Maximalgeschwindigkeit nachgewiesen.

### Vergleich zwischen der Versuchsreihe mit Eserin-Gabe und ihrer Negativkontrolle

Für den statistischen Vergleich zwischen der Versuchsreihe mit Eserin-Gabe und ihrer Negativkontrolle (Hepes anstelle von Eserin zugegeben) wurden die Differenzen zwischen den Messpunkten 67,5-65 und zwischen der Maximalgeschwindigkeit-65 verwendet. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen der Versuchsreihe mit Eserin- und ohne Eserin-Gabe ermittelt (Abb. 23 und Abb. 24).



**Abb. 23: Reihe 1** (alle transportierten Partikel): Vergleich zwischen der Versuchsreihe mit Eserin-Gabe und ihrer Negativkontrolle bei AChE<sup>+/+</sup>-Mäusen. Die blauen Boxplots zeigen die Versuche der Negativkontrolle und die grünen Boxplots die Versuche mit Eserin-Gabe. Die Boxplots stellen Minimum, Maximum und Medianwerten sowie die 25 und 75 Perzentile dar. Dreiecke und Kreise kennzeichnen Daten außerhalb der dreifachen Standardabweichung. Maximalwert der PTG = max. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen der Versuchsreihe mit Eserin-Gabe und der Negativkontrolle, bei der statt Eserin HEPES gegeben wurde, gemessen.



**Abb. 24: Reihe 2** (alle gefilterten Partikel): Vergleich zwischen der Versuchsreihe mit Eserin-Gabe und ihrer Negativkontrolle bei AChE<sup>+/+</sup>-Mäusen. Die blauen Boxplots zeigen die Versuche der Negativkontrolle und die grünen Boxplots die Versuche mit Eserin-Gabe. Die Boxplots zeigen Minimum, Maximum und Medianwerten sowie die 25 und 75 Perzentile. Dreiecke und Kreise kennzeichnen Daten außerhalb der dreifachen Standardabweichung. Maximalwert der PTG = max. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen der Versuchsreihe mit Eserin-Gabe und der Negativkontrolle, bei der Eserin durch HEPES ersetzt wurde, gemessen.



## 4 Diskussion

### 4.1 Methode zur Messung des ziliären Partikeltransports

Zur Analyse der Zilienfunktion bei AChE<sup>+/-</sup>-Mäusen und BuChE<sup>-/-</sup>-Mäusen und deren korrespondierenden WT wurde der ziliäre Partikeltransport (PTG) in einer von Klein et al. (2009) etablierten Methode gemessen. Hierbei wird der ziliäre Transport der Partikel (Dynabeads) mittels eines Eintauchobjektivs unter dem Mikroskop analysiert. Die Temperatur des Mediums (Hepes-Ringer-Puffer) wird durch ein integriertes Heizgerät im Mikroskop über die gesamte Versuchsdauer konstant bei 30°C gehalten. Die Aufnahmen erfolgen mittels einer Kamera bei Durchlicht.

Der effektive mukoziliäre Partikeltransport in der Trachea ist von vielen Parametern abhängig. Neben der Zilienschlagfrequenz (ZSF) spielen ein physiologisch ablaufender Zilienschlag und die Koordination einerseits innerhalb der zilientragenden Zelle und andererseits zwischen den Zilien tragenden Zellen eine wichtige Rolle (Wanner et al. 1996). Bei dem verwendeten Messsystem werden neben der ZSF auch die anderen wichtigen Parameter berücksichtigt.

Bereits 1953 erfolgten Messungen des ziliären Partikeltransports und der ZSF an der nervalen Kiemenplatte von *Mytilus edulis* (Seemuschel). Diese Untersuchungen ergaben, dass die PTG und die ZSF durch Pharmaka beeinflussbar sind (Bülbring et al. 1953). Diese pharmakologische Beeinflussbarkeit macht man sich auch bei dieser Messmethode zu nutze. Durch die hemmende oder stimulierende Beeinflussung der PTG mittels Pharmaka kann eine gute Vergleichbarkeit der effektiven ziliären Leistung erreicht werden.

Vielfach wurden Studien zur Zilienbewegung an mikroskopischen Wassertierchen durchgeführt (Machemer 1971, Blake 1972). Erste Modelle beschäftigten sich mit der durch den Zilienschlag induzierten, zeitgemittelten Strömung (Blake 1973, Childress 1987), wobei vielfach nur zweidimensionale Bewegungen betrachtet wurden. Spätere Modelle ermitteln numerisch den Einfluss der Synchronisierung unter verschiedenen

Geometriebedingungen und Bewegungsabläufen (Güron 2001, Mayer 2001). Cheung und Jahn (1975) stellen die These auf, dass der Sekrettransport durch eine direkte mechanische Kraftübertragung zwischen Zilien und Sekret stattfindet. Nach Brennen und Winet (1977) unterscheiden sich Zilienströmungen in geschlossenen Systemen dadurch, dass sie im Gegensatz zu Körpersekreten nicht Newtonische Fluide transportieren.

Der Zusammenhang zwischen Veränderungen der Zilienfunktion und dem effektiven Sekrettransport lassen sich erkennen, wenn die Strömung in vivo gemessen werden kann. Hussong et al. (2008) stellten erste  $\mu$ PIV Messungen an der Luftröhre der Maus vor. Es handelt sich um das hier verwendete  $\mu$ PIV/PTV Messsystem (Micro Particle Image Velocimetry), das simultane Messungen der Strömungsgeschwindigkeit und der Partikelbahnen erlaubt. Die Berechnung der Stromlinien und Partikelbahnen hat gezeigt, dass der Partikeltransport durch Trachealzilien signifikant von der durch die Zilien induzierten Strömung abweicht. In Einzelfällen wurden Richtungsschwankungen bis zu 90 Grad beobachtet (Hussong et al. 2008). Im wandnahen Bereich zeigten sich beim Fluidtransport Richtungsänderungen, die durch die Topographie des Zellgewebes und durch den Einfluss des Zilienschlages verursacht werden. Eine deutliche zeitgemittelte, räumlich begrenzte Geschwindigkeitszunahme wurde bei einer größeren Anzahl von Ziliengruppen ermittelt. Die Zunahme der Ziliendichte verhält sich proportional zur induzierten Strömungsgeschwindigkeit (Hussong et al. 2008).

Weitere frühere Veröffentlichungen beschreiben die Notwendigkeit der Interaktion zwischen Zilien und Mukus, damit es überhaupt zu einem effektiven Transport in der Trachea kommen kann (Sade et al. 1970, Wanner et al. 1996). Bei den bisher eingesetzten Messmethoden konnte die ziliäre Funktion nicht getrennt von der auf ihr liegenden Mukusschicht betrachtet werden (Connolly et al. 1978). Mit der hier verwendeten Methode ist es möglich, die PTG im Trachealepithel unabhängig von der Mukusproduktion zu bestimmen (Klein et al. 2009). Bereits Sleigh et al. (1988) entfernten bei ihren Messungen zum ziliären Partikeltransport den Mukus und ersetzten diesen durch Ringerlösung. Die Messungen ergaben eine Reduktion der

PTG und die ZSF blieb unverändert. Im verwendeten etablierten Messsystem wurde die Trachea ebenfalls vor Messbeginn in Hepes-Ringer-Puffer gewaschen, so dass sich während der PTG-Messungen keine kontinuierliche Sekretschicht aufbauen konnte. So kann die PTG ohne den zusätzlichen Einfluss des Trachealsekrets gemessen werden.

Ein weiterer Vorteil der Methode liegt darin, dass die PTG über die gesamte Länge der Trachea gemessen wird und die Messung der PTG nicht nur an Gewebeschnitten erfolgt, wie beispielsweise bei Kurosawad et al. (1995). Somit werden mögliche funktionelle Defekte, wie eine herabgesetzte Koordination zwischen thorakal und zervikal liegenden Zilien tragenden Zellen sichtbar gemacht (Klein et al. 2009).

Im Gegensatz zu früheren Partikeltransportmessungen von Burn (1954) kann in diesem Messsystem eine sehr große Datenmenge in die Ergebnisse mit einbezogen werden, da eine individuelle Geschwindigkeitsberechnung von ungefähr 300 Partikeln je Messpunkt erfolgt.

Weiterhin wurde durch die verwendete Messmethode die Temperatur über die gesamte Messdauer durch ein integriertes Heizgerät im Mikroskop konstant bei 30°C gehalten. Dies ist von großer Bedeutung, da die ZSF und die daraus resultierende PTG temperaturabhängig sind (Sleigh et al. 1988). Im Trachealepithel der Maus liegt die Temperatur bei konstanten 30°C (Zhang et al. 2004). Der Einfluss der Temperatur auf die PTG wurde durch die hier angewandte Messmethode minimiert. Mäuse, die durch mögliche Temperaturschwankungen einen geringen Partikeltransport und/oder eine langsame Anfangsgeschwindigkeit der Partikel mit Werten unter 50 µm/s aufwiesen, wurden nicht in die Ergebnisse mit einbezogen.

Die unbekannte Oberfläche der Trachea stellt eine weitere Herausforderung dar. Durch die schlagenden Zilien an der Oberfläche ist es nicht möglich, den Ort der Nullgeschwindigkeiten an der Probenoberfläche zu bestimmen (Rossi et al. 2006, Lindken et al. 2006). Der Ansatz für die Definition einer Referenzebene von Hussong

et al. (2008) basiert auf der Detektion von Tracerpartikeln, die an den Zilien haften und charakteristische Muster nach der Bildverarbeitung generieren. Die Messungen, bezogen auf die ermittelten Referenzebenen, ergaben für die Geschwindigkeitsprofile über den Zilien sehr gute Übereinstimmungen. Da bei dem verwendeten System der Durchschnittswert den allgemeinen Trend gut wiedergibt, kann dieser für vergleichende Messungen des Zilientransports vor und nach Medikamentenzugabe benutzt werden (Kummer et al. 2008, Klein et al. 2009). Dies bestätigen die vorgelegten Ergebnisse, bei denen der Partikeltransport vor und nach Zugabe von Pharmaka wie ACh und Eserin bestimmt wurde.

Insgesamt ist das hier angewendete System eine sehr sichere, zuverlässige und vielseitige Messmethode des ziliären Partikeltransports.

## 4.2 AChE- und BuChE-KO-Mäuse

Die hier dargestellte Arbeit ist die erste funktionelle Untersuchung von AChE und BuChE im respiratorischen Epithel bei AChE- und BuChE-Knockout-Mäusen und ihren korrespondierenden Wildtypen. Die verwendeten Knockout-Mäuse (KO) wurden in der Arbeitsgruppe von Oksana Lockridge (University of Nebraska Medical Center, Omaha, Nebraska, USA) generiert.

### AChE-KO-Mäuse

Bei den AChE<sup>-/-</sup>-Mäusen wurden veränderte embryonale Stammzellen (R1) genetisch verändert und in scheinträchtige Mäuse implantiert. Die Chimeren wurden dann verpaart. Zur Herstellung wurden Stammzellen aus dem Mäusestamm 129S6/SvEvTac gewonnen (Duysen et al. 2002).

Für die hier dargestellten Versuche wurden heterozygote AChE<sup>+/-</sup>-gendifiziente Mäuse verwendet, da die homozygoten AChE<sup>-/-</sup>-Mäuse aufgrund einer

Muskelschwäche nur ca. 14 Tage überlebensfähig sind. Weiterhin bedarf es ab dem 12. Tag einer speziellen Haltung der Nager, beispielsweise Diät und Handfütterung. Die physiologische Entwicklung der Tiere war verzögert. Die AChE<sup>-/-</sup>-Mäuse wiesen eine abnormale Körperhaltung und Bewegung, Tremor, fehlende Kraft für die Aufnahme fester Nahrung, verminderte Schmerzreaktion sowie eine verminderte Lautbildung auf. Im Vergleich zu ihrem WT wurden bei den AChE<sup>-/-</sup>-Mäusen Verzögerungen bei der Temperaturregulierung (Tag 22 versus 15), beim Öffnen der Augen (Tag 13 versus 12) sowie bei der Entwicklung von Reflexen (Tag 18 versus 12) nachgewiesen. Weitere verhaltensbedingte Defizite waren Zeichen von Aggressivität, Urinieren ins Nest sowie sexuelle Dysfunktionen. Diese Beobachtungen untermauern die klassische Rolle von AChE im Nervensystem, da AChE essentiell für die physische Entwicklung und die höhere Entwicklung des Gehirns ist (Duysen et al. 2002).

Anhand unterschiedlicher Studien wurde die Funktion von AChE und BuChE in den verschiedensten Geweben beschrieben. So zeigten Xie et al. (2000) an AChE<sup>-/-</sup>-Mäusen, dass in verschiedenen Organen (Herz, Thymus, Leber, Lunge, Milz, Niere, Nebenniere, Pankreas, Dünn- und Dickdarm sowie Magen) die AChE durch die BuChE ersetzt werden kann. Hierbei wurden bei den verwendeten AChE<sup>-/-</sup>-Mäusen in diesen Geweben keine Abnormalitäten nachgewiesen. In den heterozygoten AChE-Mäusen war die AChE-Aktivität auf die Hälfte reduziert und die homozygoten AChE-Mäuse wiesen gar keine AChE-Aktivität auf. Jedoch wurde bei AChE<sup>-/-</sup>-Mäusen und AChE<sup>+/-</sup>-Mäusen die gleiche BuChE-Aktivität beschrieben (Li et al. 2000, Xie et al. 2000). Durch den generell hohen Anteil an BuChE in den getesteten Geweben, die motorische Endplatte inbegriffen und durch die Tatsache, dass Mäuse ohne AChE-Aktivität überleben können, postulierten Li et al. (2000) die essentielle Funktion von BuChE in den homozygoten AChE-KO- sowie WT-Mäusen. Weiterhin reagierten die homozygoten AChE-Mäuse sehr stark auf pharmakologische Einflüsse wie Diisopropylfluorophosphat und den BuChE-Inhibitor Bambuterol. Dadurch wurde nachgewiesen, dass die BuChE und andere Enzyme in den AChE<sup>-/-</sup>-Mäusen einige Funktionen der AChE übernehmen, da die Inhibition anderer Enzyme als AChE zum Tode führte (Xie et al. 2000). Da die AChE-Aktivität für die Embryogenese sowie für

lebenserhaltende Funktionen wie die Atmung wichtig ist, muss diese durch BuChE oder andere Serinesterasen kompensiert werden. Die aktive Entwicklungsphase des Gehirns von Nagetieren (Wachstum von Axonen und Dendriten, Beginn neuronaler Verbindungen sowie Myelinisierung) erfolgt in der zweiten Woche nach der Geburt (Davison and Dobbing 1968). Robertson and Yu (1993) spekulierten, dass AChE an dem Informationsaustausch zwischen Thalamus und dem visuellen, auditiven und sensorischen Cortex beteiligt ist, da dieser Informationsaustausch auch in der 2. Woche nach der Geburt beginnt. Allerdings konnten im Vergleich zum WT keine Unterschiede nachgewiesen werden. Beide Mäusestämme konnten am 10. Tag nach ihrer Geburt hören und sehen (Xie et al. 2000).

### BuChE-KO-Mäuse

Zur Herstellung der BuChE<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden aus dem Mäusestamm 129S1/SvImJ embryonale Stammzellen (R1) gewonnen und genetisch verändert. Die veränderten Stammzellen wurden ebenfalls in scheinträchtige Tiere eingesetzt (Li et al. 2006, Duysen et al. 2007). Studien an BuChE<sup>-/-</sup>-Mäusen haben gezeigt, dass diese gesund und fortpflanzungsfähig sind. Es traten keine auffälligen Abnormalitäten im Verhalten und Erscheinungsbild auf (Li et al. 2006). Auch Menschen, bei denen keine BuChE-Aktivität gemessen werden konnte, zeigten keine auffälligen pathologischen Veränderungen, abgesehen davon, dass die Atmung nach Abklingen der Narkose mit dem Anästhetikum Succinylcholin nicht wieder einsetzte, da es nicht hydrolisiert werden kann (Lockridge und Masson 2000). Auch Li et al. konnten an BuChE<sup>-/-</sup>-Mäusen als Wirkung auf Succinylcholin eine Atemlähmung nachweisen. Weiterhin reagierten die BuChE<sup>-/-</sup>-Mäusen auf Bambuterol nicht toxisch. Hingegen führten Pilocarpin, ein muskarinischer Agonist, sowie Butyrylcholin bei den untersuchten BuChE<sup>-/-</sup>-Mäusen zum Tod und verdeutlichen den Mangel an BuChE-Aktivität beispielhaft für den Menschen (Li et al. 2008).

### 4.3 Cholinesterase-Inhibitoren

Cholinesterase-Inhibitoren sind Substanzen, die die Wirkung der AChE und/oder BuChE hemmen und damit als Blocker des ACh-Abbaus eine ACh-Anreicherung bewirken. Es werden reversible und irreversible Formen von Cholinesterase-Inhibitoren unterschieden. Bei den reversiblen Typen, deren Aufbau Azetylcholin ähnlich ist, handelt es sich um Verbindungen mit quartärem Stickstoff (Carbaminsäureester). Zu ihnen zählen unter anderem Physostigmin (Eserin), Neostigmin, Rivastigmin, Donepezil und Tacrin (Urban und Fischer 2005). Gefährlich sind Verbindungen, die eine stabile Bindung mit ACh eingehen und damit ihre Funktion vollständig blockieren. Zu diesen gehören die irreversibel wirkenden Cholinesterase-Inhibitoren, die aus Phosphorsäureestern aufgebaut sind. In der Landwirtschaft werden sie in vielen Ländern immer noch als Insektizide eingesetzt wie z.B. das als E 605 bekannte Parathion oder die in der Kriegsführung eingesetzten Nervengifte wie z.B. Tabun oder Sarin. In entsprechender Konzentration eingesetzt, können diese Verbindungen zum Tod durch Atemlähmung führen. Als weitere Symptome wurden lokale nekrotische Myopathien und respiratorische Lähmungen bis hin zum Tod beschrieben (Leonard und Salpeter 1979). Feyereisen (1995) zeigte, dass eine Überdosis von ACh bedingt durch Cholinesterase-Inhibitoren in Pestiziden oder Nervengiften toxisch wirkt. Neben diesen vegetativen Wirkungen der Cholinesterase-Inhibitoren wurden positive Effekte auf den Verlauf des Morbus Alzheimer durch die Hemmung der ACh-Abbauenzyme beobachtet (Giacobini 2000).

Bei den hier dargestellten Versuchen wurde Eserin als Inhibitor von AChE und BuChE eingesetzt, da bereits 1953 bei Untersuchungen an der nervalen Kiemenplatte von *Mytilus edulis* (Seemuschel) die direkte pharmakologische Beeinflussbarkeit von ZSF und PTG durch Eserin beschrieben wurde (Bülbring et al. 1953). Bei Eserin (Physostigmin) handelt es sich um ein giftiges Alkaloid aus dem Samen der Kalabarbohne, welches durch Cholinesterasehemmung parasymphathomimetisch wirkt. Als Antidot bei Vergiftung oder Überdosierung werden Atropin oder Benzodiazepine gegeben. Eine Vergiftung durch Eserin geht mit

einer starken Reizung des cholinergen Systems einher: mit Symptomen wie Miosis, Sialorrhö, Erbrechen, Durchfälle, Koliken, Schweißausbrüche, Lungenödem, Bradykardie, Dyspnoe bis hin zur Atemlähmung (Urban und Fischer 2005). Bülbring et al. (1953) beobachteten bei ihren Untersuchungen an der Seemuschel nach Applikation von ACh und Eserin eine verstärkte Zilienaktivität. Eine gesteigerte Zilienaktivität durch Gabe von ACh konnte bei den durchgeführten Versuchen ebenfalls gezeigt werden. In einer weiteren Veröffentlichung wird beschrieben, dass durch die Gabe von ACh in geringer Konzentration die Flimmertätigkeit beschleunigt werden konnte, durch hohe Konzentration diese jedoch gehemmt wurde. Bei ihren Versuchen zeigte der Cholinesterasehemmstoff Eserin das gleiche Verhalten wie ACh (Kordik et al. 1952). Atropin und Tubocurarin verlangsamten den Flimmerschlag; Adrenalin beschleunigte ihn und Noradrenalin blieb ohne Effekt (Kordik et al. 1952). Entsprechende Befunde wurden auch an Gewebekulturen von Biopsien menschlicher Trachealschleimhaut nachgewiesen (Corssen und Allen 1959). Nach Gabe des AChE-Inhibitors Neostigmin wurde ein reduziertes Atemvolumen sowie eine reduzierte Funktion des Musculus genioglossus und des Diaphragmas beobachtet (Eikermann et al. 2007).

Mit den hier vorliegenden Ergebnissen konnte die direkte Beeinflussbarkeit der PTG durch ACh und den Cholinesterase-Inhibitor Eserin gezeigt werden. Im Gegensatz zu anderen Veröffentlichungen bewirkte ACh in hohen Konzentrationen im Trachealepithel der Maus eine Steigerung der PTG. Die Gabe von Eserin bedingte eine Reduktion der PTG. Allerdings wurde die PTG durch Eserin nicht weiter reduziert als dies auch durch Hepes bewirkt wurde. Eserin zeigte keinen Einfluss auf die zuvor durch ACh stimulierte PTG, da ACh auch nach vorheriger Gabe von Eserin als Stimulans auf die PTG wirkte.



#### 4.4 Einfluss von ACh auf die PTG im Trachealepithel

Im Trachealepithel der hier untersuchten Knockout-Mäuse und ihren korrespondierenden Wildtypen bewirkte ACh eine Steigerung des ziliären Partikeltransports.

Bülbring et al. (1953) beobachteten an der Kiemenplatte der Seemuschel *Mytilus edulis* ebenfalls eine Steigerung der Zilienaktivität nach ACh-Gabe. In der Schweinetrachea wurde durch ACh-Applikation sogar eine dreifach gesteigerte mukoziliäre Transportrate erreicht (Ballard et al. 2002). Im Gegensatz hierzu stehen vergangene Untersuchungen von Kordik et al. (1952). Hier führte ACh in geringen Konzentrationen zu einer Beschleunigung und in hohen Konzentrationen zu einer Hemmung der Flimmertätigkeit (Kordik et al. 1952).

Gegensätzlich dazu stehen vorliegende Ergebnisse. Hier bewirkten hohe Konzentrationen von ACh eine signifikante Steigerung der PTG und bei ACh in niedrigen Konzentrationen wurde eine signifikante Reduktion der PTG beobachtet. Allerdings wird bei der anfänglich signifikanten Reduktion der PTG vermutet, dass diese nicht durch die Gabe von ACh zustande kommt. Vielmehr wird von einer anfänglichen Regulierung des Systems ausgegangen, da es bei allen gemessenen Mäusestämmen bis zu 55 min nach Organentnahme zu einem Abfall der PTG kommt.

Weiterhin besteht die Vermutung, dass die PTG noch zu hoch ist, um die PTG durch die Zugabe von ACh in niedrigen Konzentrationen nochmals nachweislich zu steigern. Diese Vermutung wird durch die vorliegenden Ergebnisse, bei denen die Wirkung von Eserin auf die zuvor mit ACh stimulierte PTG gemessen wurde, untermauert. Bei diesen Versuchen wurde erst 55 min nach Organentnahme Eserin bzw. Hepes zugegeben. Alle untersuchten Mäuse verhielten sich zu Beginn der Messung identisch und auch ohne Zugabe von Pharmaka kommt es zu einem Abfall der PTG. Im statistischen Vergleich wurden nach ACh-Gabe keine signifikanten Unterschiede zwischen  $AChE^{+/-}$ ,  $BuChE^{-/-}$ -Mäusen und ihren WT nachgewiesen.

AChE und BuChE sind neben den neuronalen auch in den unterschiedlichsten non-neuronalen Geweben für den Abbau von ACh verantwortlich. Der Abbau von ACh erfolgt aber nicht in allen non-neuronalen Geweben durch beide Cholinesterasen (AChE und BuChE). In der Plazenta wird ACh vorrangig von der AChE abgebaut (Sastry 1997), wohingegen in der Skelettmuskulatur, außerhalb der Endplatte, hauptsächlich die BuChE für den ACh-Abbau verantwortlich ist (Norel et al. 1993). Durch Untersuchungen an AChE<sup>-/-</sup>-Mäusen wird vermutet, dass in anderen Organen (Herz, Thymus, Leber, Lunge, Milz, Niere, Nebenniere, Pankreas, Dünn- und Dickdarm sowie Magen) die AChE durch die BuChE ersetzt werden kann, da sich in diesen Geweben keine Abnormalitäten bei den AChE<sup>-/-</sup>-Mäusen zeigten (Xie et al. 2000). Aus diesem Grund wurde erwartet, dass die jeweiligen KO-Mäuse signifikante Unterschiede gegenüber ihren WT aufweisen, da bei den KO-Mäusen die jeweilige Cholinesterase ausgeschaltet ist. Da sich aber alle getesteten Mäusestämme (AChE<sup>+/-</sup>-Mäuse, BuChE<sup>-/-</sup>-Mäuse sowie deren korrespondierende WT) auf die ACh-Gabe nahezu identisch verhielten, lässt sich vermuten, dass im Trachealepithel der Maus weder die AChE noch die BuChE für den Abbau von ACh verantwortlich sind. Anhand der durchgeführten Versuche kann keine exakte Aussage über die genaue Funktion von AChE und BuChE beim ACh-Abbau im Trachealepithel der Maus getroffen werden. Im statistischen Vergleich von KO-Mäusen und ihren WT hätte sich ein signifikanter Unterschied im Sinne einer deutlich erhöhten PTG zeigen müssen. Dies wäre zu erwarten gewesen, da das vorhandene sowie das zusätzlich applizierte ACh in den KO-Mäusen nicht abgebaut werden kann, da die Cholinesterasen in diesen Mäusestämmen ausgeschaltet sind.

Weiterhin wurde durch die vorliegenden Ergebnisse der Nachweis von Hayashi et al. bestätigt, dass die Zugabe von ATP (100 µM) die Schlagfrequenz der Zilien tragenden Zellen in der Trachea steigert (Hayashi et al. 2005), da alle getesteten Mausstämmen nach ATP-Stimulation eine signifikant gesteigerte PTG oder tendenzielle Anstiege der PTG aufwiesen. Die ATP-Gabe in den vorliegenden Untersuchungen diente hauptsächlich dazu, die Vitalität der jeweiligen gemessenen Trachea zu bestätigen. Zusätzlich zeigen die Ergebnisse eine Steigerung der PTG und somit kann ATP auch als Stimulans der ZSF beschrieben werden.

#### 4.5 Einfluss von Eserin auf die PTG im Trachealepithel

Der Cholinesterasehemmstoff Eserin bewirkte im Trachealepithel der hier untersuchten Knockout-Mäuse und ihren korrespondierenden Wildtypen eine Reduktion des ziliären Partikeltransports. Vorangegangene Nachweise von Kordik et al. (1952) zeigten, dass die Gabe von Eserin das gleiche Verhalten auf die Flimmertätigkeit der Zilien tragenden Zellen zeigt wie ACh. In geringen Konzentrationen beschleunigte die Eserin-Gabe die Flimmertätigkeit des Trachealepithels und in hohen Konzentrationen hemmte sie diese. Im Gegensatz dazu zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass die Gabe von Eserin in allen verwendeten Konzentrationen ( $10^{-7}$  M,  $10^{-6}$  M und  $10^{-5}$  M) zu einer Reduktion der PTG führte. Allerdings wird bei der verwendeten Konzentration von  $10^{-7}$  M Eserin vermutet, dass diese signifikante Reduktion der PTG nicht durch die Gabe von Eserin zustande kommt, sondern durch die anfängliche Regulierung des Systems bedingt ist. Da es bei allen gemessenen Mäusestämmen bis zu 55 min nach Organentnahme zu einem Abfall der PTG kommt. Verstärkt wird diese Vermutung durch die Negativkontrolle mit Hepes. Bei diesen Versuchen wurde erst 55 min nach Organentnahme Eserin bzw. Hepes zu gegeben und auch ohne Zugabe von Pharmaka kommt es zu einem Abfall der PTG. Im statistischen Vergleich zwischen den AChE-KO-Mäusen und ihren WT ergaben sich nach der Gabe von Eserin keine signifikanten Unterschiede, wodurch die Vermutung bestätigt wird, dass die AChE nicht für den Abbau von ACh im Trachealepithel der Maus verantwortlich ist. Da es sich bei Eserin um einen Inhibitor der Cholinesterasen handelt, hätte die Gabe von Eserin im AChE-WT-Stamm eine Steigerung der PTG bewirken müssen, wenn der Abbau von ACh durch die Cholinesterasen erfolgen würde. Weiterhin zeigten die Ergebnisse, dass alle untersuchten Mäusestämme nach vorheriger Eserin-Gabe auf die ATP-Stimulation mit einer signifikant gesteigerten PTG oder tendenziellen Anstiegen der PTG reagierten. Durch die ATP-Gabe wurde in der Eserin-Konzentrationsreihe wie in der ACh-Konzentrationsreihe einerseits die Funktion als Stimulans der ZSF sowie die dadurch entstehende Steigerung der PTG und andererseits die Vitalität der jeweiligen gemessenen Trachea nachgewiesen.

#### **4.6 Einfluss von Eserin auf die durch ACh stimulierte PTG im Trachealepithel**

Im Trachealepithel der Maus hat Eserin keinen Einfluss auf die zuvor durch ACh stimulierte PTG. ACh wirkt auch nach vorheriger Gabe von Eserin bei den AChE-WT-Mäusen als Stimulans auf die PTG. Es wurden in beiden Versuchsreihen, ob nach vorheriger Gabe von Eserin oder von Hapes, auf ACh signifikante Steigerungen der PTG beobachtet. Damit wurde für ACh die Funktion als Stimulans auf die PTG auch nach vorheriger Gabe eines Inhibitors der Cholinesterasen bestätigt. Die hier durchgeführten Versuche wurden an AChE<sup>+/+</sup>-Mäusen durchgeführt, bei denen durch Eserin beide Cholinesterasen (AChE und BuChE) inhibiert wurden. Die Ergebnisse bestätigen die Vermutung, dass keine der beiden Cholinesterasen für den Abbau von ACh im Trachealepithel der Maus zuständig ist, da sich eine Reduktion und keine Steigerung der PTG nach Eserin-Gabe zeigte. Die zusätzliche Gabe erbrachte den erwarteten Anstieg der PTG und bestätigte somit die Funktion von ACh als Stimulans für die PTG. Wenn die beiden Cholinesterasen für den Abbau von ACh im Trachealepithel zuständig wären und diese durch den Inhibitor Eserin ausgeschaltet werden würden, hätte eine Steigerung der PTG erfolgen müssen.

#### **4.7 Abbau von ACh im respiratorischen Epithel**

Im Nervensystem wird das extrazelluläre ACh durch die AChE und die BuChE abgebaut (Wessler und Kirkpatrick 2001). An der motorischen Endplatte und in vielen weiteren Geweben wird ACh durch die AChE enzymatisch gespalten. Die vorgestellten Ergebnisse an der Trachea sollen, beispielhaft für das non-cholinerge System, zeigen durch welche der beiden Esterasen der Abbau von ACh im respiratorischen Epithel erfolgt.

Neben AChE sind weitere Esterasen und Isoformen von AChE bekannt, die ACh spalten können; die Bekannteste unter ihnen ist die BuChE. Alle AChE-Isoformen sind aus mehreren Exons zusammengesetzt, wobei die Exons 2, 3 und 4 des Gens

die codierende Region (katalytische Domäne) darstellen (Soreq et al. 1990). Durch alternatives Spleißen des C-terminalen Endes entstehen die unterschiedlichen AChE-Isoformen (Taylor und Radic 1994).

AChE<sub>R</sub> wurde in embryonalen Geweben und Zellkulturen (Li et al. 1991) sowie in Tumorzellen (Karpel et al. 1994) nachgewiesen. Weiterhin wurde AChE<sub>R</sub> in den Erythrozyten der Maus, aber nicht in denen des Menschen gefunden (Li et al. 1993). Unter physiologischem Stress und unter AChE-Inhibition kann AChE<sub>R</sub> im Gehirn von Menschen und Mäusen hochreguliert werden (Kaufer et al. 1998). AChE<sub>H</sub> wurde am häufigsten an der Oberfläche von Erythrozyten beobachtet, wo sie das im Blutstrom befindliche ACh abbaut (Liao et al. 1992). Die AChE<sub>S</sub> kommt ausschließlich im Gift bestimmter Schlangen vor (Cousin et al. 1996). Im Gegensatz hierzu weist die BuChE keine Isoformen auf. Blong et al. (1997) konnten nachweisen, dass die räumliche Struktur von BuChE der AChE<sub>T</sub>-Isoform entspricht. Am häufigsten wurde AChE<sub>T</sub> in Synapsen gefunden (Massoulié 2002).

Das Enzym AChE wirkt mit einer sehr schnellen Umsetzungsrate. Dadurch wird die ACh-Wirkung sehr effektiv räumlich und auch zeitlich begrenzt (Rosenberry 1975). Die physiologische Bedeutung dieser schnellen Umsetzung im cholinergen System wird von der kurzen postnatalen Überlebensrate der AChE-gendefizienten Mäuse unterstrichen (Duysen et al. 2002). Die kurze postnatale Überlebensrate kann sich von zwei Wochen bis hin zu 100 Tagen erstrecken, ist aber abhängig von speziellen diätischen Umständen. Die untersuchten AChE<sup>-/-</sup>-Mäuse überlebten aufgrund einer Muskelschwäche nur bis zu 14 Tagen und ihre physiologische Entwicklung war nachgewiesen verzögert (Duysen et al. 2002, Li et al. 2000).

Aufgrund des schnellen extrazellulären Abbaus von ACh, ergaben sich weitere Fragen für das cholinerge System. Im respiratorischen Epithel wird weniger ACh produziert als in den Neuronen. Bei FVB-Mäusen (WT) und OCT1/2<sup>-/-</sup> (KO) wurde die Gesamtmenge an ACh sowie die Lokalisation bestimmt. Für den ACh-Gehalt im abgeschabten Trachealepithel ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (FVB:  $17.34 \pm 4.07$  pmol/mg; n = 11; OCT1/2<sup>-/-</sup>:  $15.90 \pm 4.0$  pmol/mg; n = 9). Die gesamte

Menge an epitheliale ACh war in OCT1/2<sup>-/-</sup> signifikant ( $p < 0,01$ ) höher ( $42 \pm 10$  % von den abgeschabten Proben) als in den korrespondierenden WT (FVB-Mäusen  $16,8 \pm 3,6$  %). Weiterhin wurden Proben der Trachea mit intaktem Epithel analysiert. Diese Untersuchungen ergaben  $36,5 \pm 4,4$  pmol/mg in FVB-Mäusen ( $n = 4$ ) and  $28,5 \pm 3,50$  pmol/mg in OCT1/2<sup>-/-</sup>-Mäusen ( $n = 3$ ). Lediglich 17% des gesamten AChs der Trachea wurden in der Trachealwand von FVB-Mäusen nachgewiesen und noch weniger ACh wurde im abgeschabten Trachealepithel bestimmt. Weiterhin war die intrazelluläre Konzentration der trachealen, cholinergen Nervenfasern auffällig höher als die der respiratorischen Epithelzellen (Kummer et al. 2006).

In sekretorischen und endokrinen Zellen erfolgt die Freisetzung von ACh über VACHT. Aus den Epithelzellen wird ACh mittels transmembranärer Transportersysteme (OCT/CHT1) freigesetzt. Nur bei annähernd 10000 Molekülen erfolgt die Freisetzung von ACh über Vesikel und Exozytose. Somit wird von den Epithelzellen weniger extrazelluläres ACh freigesetzt als von cholinergen Nervenfasern (Kummer et al. 2008). Diese Annahme wird durch direkte Messungen unterstützt. Es sind zwei wichtige Beispiele für direkte Messungen von non-neuronaler ACh-Freisetzung in das umgebende Gewebe in vivo (menschliche Haut: Schlereth et al. 2006, 2007) und in Kulturen von frisch isolierten Biopsien (menschliche Plazenta: Wessler et al. 2001a) bekannt. Allerdings wurde bei den meisten epithelialen Oberflächen, die respiratorische Mukosa eingeschlossen, nur die intrazelluläre Konzentration und nicht die extrazelluläre gemessen. Daher ergibt sich im Hinblick auf die wichtigen parakrinen Effekte von ACh im Bezug auf die extrazelluläre Konzentration die Frage nach einem effektiven extrazellulären ACh-Abbausystem (Kummer et al. 2008).

Alternativ steht hierzu die Annahme, dass ACh über intrazelluläre Rezeptoren verfügt (Wessler et al. 2001b). Es scheint, dass der Abbau von epitheliale ACh gering ist und dadurch auch die geringe Konzentration von parakrinem ACh bedingt ist. Untersuchungen am Epithel von Meerschweinchen zeigten keine Spaltung von ACh (Small et al. 1990) und nur eine geringe AChE-Aktivität (117 mU/mg pro Epithelsegment) in der Trachealmukosa, die auch subepitheliale Nervenfasern

beinhaltet (Chen et al. 2005). Lediglich 40% der AChE-Aktivität konnten hier durch den potenten AChE-Inhibitor Neostigmin blockiert werden (Chen et al. 2005). Weitere pharmakologische Studien, bei denen verschiedene Inhibitoren verwendet wurden, konnten keinen fundierten Nachweis für eine AChE-Aktivität im respiratorischen Epithel erbringen (Koga et al. 1992, Degano et al. 2001). Eine elektromikroskopische Studie von 1966 zeigte in den Zilien tragenden Zellen des Respirationstraktes der Ratte eine azetylcholinhaltige Doppelmembran. Bei der verwendeten Schleimhaut der Trachea von erwachsenen Albinoratten ergab der spezifische Nachweis der AChE mit Azetylthiocholin nach Karnovsky (1964) eine feinkörnige, positive Reaktion an der die Basalknötchen verbindenden Doppelmembran. Becherzellen sowie Kernmembran blieben negativ und die Flimmerhaare selbst zeigten nur gelegentlich einen schwachen Niederschlag (Graf und Stockinger 1966). Bei einer weiteren histochemischen in-vitro Studie der fetalen Lunge wurde in epithelialen Zellen ein AChE-haltiges Granulat beobachtet. Durch den Nachweis dieser Zellen wurden die Kriterien für einen intrapulmonalen Chemorezeptor aufgezeigt (Morikawa et al. 1978). Auch spätere histochemische Untersuchungen an Mensch, Ratte und Maus enthüllten eine AChE- und BuChE-Aktivität in den Nervenfasern, die die glatten Muskelzellen in den Atemwegen innervieren (Mensch: Partanen et al. 1982; Ratte: Small et al. 1990, Ohri et al. 1991; Maus: Kummer et al. 2008). Hier wurde ein Abbau von ACh, wenn auch nur ein geringer, nachgewiesen. Dieser geringe Abbauprozess wird für die auto/parakrinen Effekte bei der geringen Menge an ACh-Freisetzung durch die Endothelzellen benötigt (Kummer et al. 2008).

#### **4.8 Schlussfolgerung**

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von AChE und BuChE auf die ziliäre PTG im Epithel der Trachea von AChE<sup>+/-</sup>-Mäusen, BuChE<sup>-/-</sup>-Mäusen und ihren korrespondierenden WT untersucht. Die Untersuchungen haben gezeigt, dass ACh die ZSF und PTG steigern kann. Allerdings sind AChE und BuChE nicht für den Abbau von ACh im Trachealepithel der Maus verantwortlich. Zu dieser Schlussfolgerung führt die Tatsache, dass die untersuchten KO-Mäuse im

Trachealepithel der Maus keine Abnormalitäten gegenüber ihren WT zeigen und nicht sensitiv auf den Inhibitor Eserin reagieren.

Möglicherweise hängt der Abbau von ACh im Trachealepithel eng mit der mukoziliären Clearance zusammen. Bei einem erhöhten Angebot an ACh und einer erhöhten ZSF könnte es zum Abtransport von ACh mittels Anheftung am Trachealsekret kommen. Das Trachealsekret fungiert bei diesem Selbstreinigungs- und Abwehrprozess der Atemwege als mechanische Barriere. Eindringene Fremdkörper, sowie Mikroorganismen und Noxen heften sich an das Trachealsekret. Gemeinsam mit dem Trachealsekret werden Fremdkörper, Mikroorganismen und Noxen durch einen koordinierten Zilienschlag kehlkopfwärts transportiert (Wanner et al. 1996). Die Effektivität dieses Reinigungsprozesses ist abhängig von der Interaktion der Zilien mit dem über ihnen liegenden Mukus. Nach Knowles et al. (2002) hängt der erfolgreiche Partikeltransport von den Parametern ZSF und der richtigen Quantität sowie viskoelastischen Eigenschaften des Trachealsekrets ab. Sleigh et al. (1988) beschrieben ebenfalls die Wichtigkeit des Trachealsekrets beim Ablauf der mukoziliären Clearance. Bei ihren Untersuchungen ersetzten sie die Mukusschicht durch Ringerlösung. Die Messungen ergaben eine Reduktion des Partikeltransports ohne Veränderung der ZSF (Sleigh et al. 1988).

Das non-neuronale cholinerge System spielt eine große Rolle bei Krankheiten und Allergien. Im Hinblick auf den Abbau von ACh im Trachealepithel bedarf es aus diesem Grund weiteren Untersuchungen. Es wäre interessant in weiteren Studien heraus zu finden, wie ACh im Trachealepithel der Maus abgebaut wird, wenn AChE und BuChE keinen Einfluss auf den Abbau nehmen.



## 5 Zusammenfassung

Die Acetylcholinesterase (AChE) ist mit einer katalytischen Effizienz von  $14000 \text{ [s}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{l}]$  eines der schnellsten Enzyme. Sie ist für die enzymatische Spaltung von Acetylcholin (ACh) in Cholin und Azetat verantwortlich. Neben der AChE ist auch die Butyrylcholinesterase (BuChE) in der Lage ACh durch Hydrolyse abzubauen. Im Gegensatz zur BuChE weist die AChE mehrere Isoformen auf: AChE<sub>R</sub>, AChE<sub>H</sub>, AChE<sub>S</sub> und AChE<sub>T</sub>. Die BuChE entspricht in ihrer räumlichen Struktur der häufigsten AChE-Isoform, der AChE<sub>T</sub>.

Die Synthese und Freisetzung von ACh wurde im respiratorischen Epithel der Trachea bereits nachgewiesen. Jedoch waren der hydrolytische Abbau von ACh sowie das Vorkommen und die Aktivität von BuChE in den Atemwegen bisher noch ungeklärt. Es stellte sich die Frage, ob ACh im Trachealepithel ebenfalls durch AChE und BuChE abgebaut wird, wie dies bereits für das Nervensystem und den Skelettmuskel beschrieben wurde. In der vorliegenden Arbeit wurde der ACh-Abbau im respiratorischen Epithel der Trachea von AChE-, BuChE-Knockout (KO)-Mäusen und ihren korrespondierenden Wildtypen (WT) mittels eines funktionellen Modells untersucht. Hierbei wurde die Trachea aus den verwendeten Mäusen entnommen und der Länge nach mit dem M. trachealis nach oben unter dem Mikroskop aufgespannt. Die ziliäre Partikeltransportgeschwindigkeit (PTG) wurde durch die Zugabe von Polystyrenkügelchen (Dynabeads) mittels eines Eintauchobjektivs unter dem Mikroskop sichtbar gemacht und mit Hilfe eines Computerprogramms berechnet. Damit ist die hier dargestellte Studie die erste funktionelle Untersuchung der AChE und BuChE im respiratorischen Epithel von AChE- und BuChE-KO-Mäusen.

Die hier vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass ACh eine Steigerung der PTG in beiden KO-Mäusestämmen und ihren korrespondierenden WT bewirkte, die nicht durch Eserin beeinflusst wurde. Die Gabe von Eserin hätte eine Steigerung der PTG bewirken müssen, wenn der Abbau von ACh durch die Cholinesterasen erfolgen

würde, da Eserin ein Inhibitor der Cholinesterasen ist. Weiterhin hätte man Veränderungen in den KO-Mäusen erwartet.

In weiterführenden Studien wird zu klären sein, wie ACh im Trachealepithel abgebaut wird. Es wäre denkbar, dass ACh nicht abgebaut wird, sondern durch die mukoziliäre Clearance einfach nur abtransportiert wird. Weiterhin könnte es möglich sein, dass das von den Nervenfasern, die die glatten Muskelzellen der Atemwege innervieren, freigesetzte ACh für den Abbau der geringen Menge ACh, die im respiratorischen Epithel vorliegt, ausreicht.

Im Hinblick auf die Rolle des non-neuronalen cholinergen Systems in der Pathogenese von Erkrankungen der Atemwege sowie der Funktion des respiratorischen Systems als Modellsystem für das non-neuronale cholinerge System erscheint es von großem Interesse, herauszufinden, ob und/oder wie ACh im Trachealepithel abgebaut wird.

## 6 Summary

Acetylcholinesterase (AChE) is one of the fastest enzymes with a catalytic efficiency of 14000 [ $\text{s}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{l}$ ]. AChE cleaves acetylcholine (ACh) into acetate and choline. Butyrylcholinesterase (BuChE) is also able to degrade ACh but with a lower metabolic rate and specificity. The spatial structure of BuChE is similar to that of AChE<sub>T</sub> which is the major isoform of AChE. AChE<sub>R</sub>, AChE<sub>H</sub> and AChE<sub>S</sub> are also well known isoforms of AChE.

Synthesis and release of ACh has already been described for the respiratory epithelium. It is still an open question whether ACh is degraded in the tracheal epithelium by AChE and/or BuChE as known for nervous system and skeletal muscle, respectively. Ciliary action of the airway epithelial cells drives the removal of mucus and particles from the airways. Mucociliary transport is regulated by muscarinic receptors via ACh. On this background AChE- and BuChE-knockout (KO) mice were used in the functional model of cilia-driven particle transport for which the mice were killed, tracheas removed, transferred to culture dishes and cut open at the musculus trachealis. Polystyrene beads were added and their movement were imaged with a light microscope with a water immersion objective and camera. Cilia-driven particle transport speed (PTS) was calculated from these images using a specifically software.

The results showed an enhanced particle transport speed after addition of ACh equal which mouse strain was used. Furthermore the addition of Eserin that is an inhibitor of AChE and BuChE did not result in any differences in the PTS after application prior to the use of ACh. If ACh would be degraded by AChE or BuChE it would have been assumed that in the KO mice strains would differences in their particle transport speed. Thus, it is hypothesised that ACh is not degraded. Maybe it is removed by the mucociliary transport. Another hypothesis is that the AChE released from the nervous system that is innervating the tracheal muscle and glands also hydrolysis the little amount of ACh that is found in the respiratory epithelium. The investigation of this issue will be the work of follow up studies.

With regard to the pathogenesis of asthma and other diseases of the respiratory tract where ACh is involved it might be of special interest to know how ACh will be degraded in the airway epithelium.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

### A

Azetyl-Coenzym A	AcetylCoA
Azetylcholin	ACh
Azetylcholinchlorid	AChCl
Azetylcholinesterase	AChE
Adenosintriphosphat	ATP

### B

Butyrylcholinesterase	BuChE
-----------------------	-------

### C

Cholinacetyltransferase	ChAT
circa	ca.

### E

Eserin Hemisulfat	Eserin
Ethanol absolut	Ethanol

### G

Grad Celsius	°C
--------------	----

### H

Hertz	Hz
heterozygot	<sup>+/-</sup> (KO-Mäuse)
homozygot	<sup>-/-</sup> (KO-Mäuse); <sup>+/+</sup> (WT-Mäuse)

### K

Kilodalton	kDa
Knockout	KO
Kollagen Q	ColQ

### M

Milliliter	ml
Minuten	min
Mikroliter	µl
Mikrometer	µm
Mol/l	M
Mittelwert	MW
Micro Particle Image Velocimetry	µPIV

### O

Organischer Kationentransporter	OCT
Organische Phosphorverbindungen	OPC

**P**

Partikeltransport	PT
Partikeltransportgeschwindigkeit	PTG
prolinreiche Bindungsdomäne	PRAD
prolinreicher Membrananker	PRIMA
Prozent	%

**S**

Sekunden	s
Standard Error of the Mean (Standardfehler)	SEM
Stunden	h

**V**

Vesikulärer Azetylcholin-Transporter	VACht
--------------------------------------	-------

**W**

Wildtyp	WT +/+
---------	--------

**Z**

Zilienschlagfrequenz	ZSF
----------------------	-----

## 8 Literaturverzeichnis

**Barthold CL, Schier JG.** (2005) Organic phosphorus compounds – nerve agents. *Crit Care Clin* 21: 673-689.

**Blake J.** (1972) A model for the micro-structure in ciliated organisms. *J Fluid Mech* 55: 1-23.

**Blake J.** (1973) A Finite Model for ciliated Micro-Organisms. *J Biomech* 6: 133-140.

**Blong RM, Bedows E, Lockridge O.** (1997) Tetramerization domain of human butyrylcholinesterase is at the C-terminus. *J Bio Chem* 327: 747-757.

**Bon S, Coussen F, Massoulié J.** (1997) Quaternary associations of acetylcholinesterase. II. The polyproline attachment domain of the collagen tail. *J Biol Chem* 272: 3016-3021.

**Brennen C, Winlet H.** (1977) Fluid Mechanics of Propulsion by Cilia and Flagella. *Ann Rev Fluid Mech* 9: 339-398.

**Bülbring E, Burn JH, Shelley HJ.** (1953) Acetylcholine and ciliary movement in the gill plates of *mytilus edulis*. *Proc Roy Soc B* 141: 445-466.

**Chen HH, Lin YR, Peng QG, Chan MH.** (2005) Effects of trichloroethylene and perchloroethylene on muscle contractile responses and epithelial prostaglandin release and acetylcholinesterase activity in swine trachea. *Toxicol Sci* 83: 149-154.

**Cheung AT, Jahn TL.** (1975) Determination of the movement pattern of the epithelial cilia of rabbit trachea and the clearance mechanism of the tracheal muco-ciliary clearance system. *Swimming and Flying in nature*, New York: Plenum, Vol. 1: 289-300.

**Cheung AT, Winet H.** (1975) Flow velocity profile over a ciliated surface. *Swimming and Flying in nature*, New York: Plenum, Vol. 1: 223-234.

**Childress S, Koehl MAR, Miksis M.** (1987) Scanning currents in Stokes flow and the efficient feeding of small organisms. *J Fluid Mech* 177: 407-436.

**Corsen G, Allen C R.** (1959) Acetylcholine; its significance in controlling ciliary activity of human respiratory epithelium in vitro. *J Appl Physiol* 14: 901-904.

- Davison AN, Dobbing J.** (1968) The developing brain. *Contemp Neurol Ser* 4-5: 253-286.
- Degano B, Prévost MC, Berger P, Molimard M, Pontier S, Rami J, Escamilla R.** (2001) Estradiol decreases the acetylcholine-elicited airway reactivity in ovariectomized rats through an increase in epithelial acetylcholinesterase activity. *Am J Respir Crit Care Med* 16: 1849-1854.
- Dobransky T, Rylett RJ.** (2003) Functional regulation of choline acetyltransferase by phosphorylation. *Neurochem Res* 28: 537-542.
- Drenckhahn D.** (2003) Kapitel: Zellenlehre, in Benninghoff Anatomie, Urban & Fischer Verlag, München, Jena, Band 1: 9-91.
- Deschamps D, Questel F, Baud FJ, Gervais P, Dally S.** (1994) Persistent asthma after acute inhalation of organophosphate insecticide. *Lancet* 344: 1712.
- Duysen EG, Li B, Darvesh S, Lockridge O.** (2007) Sensitivity of butyrylcholinesterase knockout mice to (-)-huperzine A and donepezil suggests humans with butyrylcholinesterase deficiency may not tolerate these Alzheimers disease drugs and indicates butyrylcholinesterase function in neurotransmission. *Toxicology* 233: 60-69.
- Duysen EG, Stribley JA, Fry DL, Hinrichs SH, Lockridge O.** (2002) Rescue of the Acetylcholinesterase knockout mouse by feeding a liquid diet; phenotype of the adult acetylcholinesterase deficient mouse. *Dev Brain Res* 137: 43-54.
- Eikermann M, Fassbender P, Malhotra A, Takahashi M, Kubo S, Jordan AS, Gautam S, White DP, Chamberlin NL.** (2007) Unwarranted administration of acetylcholinesterase inhibitors can impair genioglossus and diaphragm muscle function. *Anesthesiology* 107: 621-9.
- Eskenazi B, Bradman A, Castorina R.** (1999) Exposures of children to organophosphate pesticides and their potential adverse health affects. *Environ Health Perspect* 107: 409-419.
- Erwins AJ.** (1914) Acetylcholine, a new active principle of ergot. *Biochem J* 8: 44-49.
- Feng G, Krejci E, Molgo J, Cunningham JM, Massoulié J, Sanes JR.** (1999) Genetic analysis of collagen Q: Roles in acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase assembly and in synaptic structure and function. *J Cell Biol* 144: 1349-1360.
- Feyereisen R.** (1995) Molecular biology of insecticide resistance. *Toxicol Lett*: 82-90.



- Giacobini E.** (2000) Cholinesterases and Cholinesterase Inhibitors. London, Martin Duniz
- Graf J, Stockinger L.** (1966) Endoplasmatisches Retikulum und Reizleitung im Flimmerepithel: Darstellung der Cholinesterase. Zeitschrift für Zellforschung 72: 184-192.
- Greenfield S.** (1996) Non-classical actions of cholinesterases: role in cellular differentiation, tumorigenesis and Alzheimer`s disease. Neurochem Int. 28: 485-490.
- Grisaru D, Sternfeld M, Eldor A, Glick D, Soreq H.** (1999) Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology. Eur J Biochem 264: 672-686.
- Güron S, Levit-Gurevich K.** (2001) A three-dimensional model of ciliary motion based on the internal 9+2 structure. Proc R Soc Lond B 268: 599-607.
- Hayashi T, Kawakami M, Sasaki S, Katsumata T, Mori H, Yoshida H, Nakahari T.** (2005) ATP regulation of ciliary beat frequency in rat tracheal and distal airway epithelium. Exp Physiol 995: 535-544.
- Hoppin JA, Umbach DM, London SJ, Henneberger PK, Kullman GJ, Alavanja MC.** (2007) Pesticides and Atopic and Non-Atopic Asthma Among Farm Women in the Agricultural Health Study. Am Respir Crit Care Med 177: 11-18.
- Hoppin JA, Umbach DM, London SJ, Lynch CF, Alavanja MC, Sandler DP.** (2006) Pesticides and adult respiratory outcomes in the agricultural health study. Ann NY Acad Sci 1076: 343-354.
- Hussong J, Faulhammer P, Noreikat K, Kummer W, Sharp KV, Kindken R.** (2008) In vivo  $\mu$ PIV Messungen an Zilien in Mäuseluftröhren. Paper: Fachtagung „Lasermethoden in der Strömungsmesstechnik“, Karlsruhe, 9.-11. Sept. 2009.
- Johansson M, Norberg A.** (1993) Pharmacokinetic studies of cholinesterase inhibitors. Acta Neurol Scand 149: 22-125.
- Kadota H, Kuwahara M, Nishibata R, Mikami H, Tsubone H.** (2001) Effects of acetylcholinesterase activity on pathogenesis of airway hyperresponsiveness in guinea pigs. Exp Anim 50: 91-95.
- Karpel R, Ben Aziz-Aloya R, Sternfeld M, Ehrlich G, Ginzberg D, Tarroni P, Clementi F, Zakut H, Soreq H.** (1994) Expression of three alternative acetylcholinesterase messengerRNAs in human tumor cell lines of different tissue origins. Exp Cell Res 210: 268-277.

**Kaufer D, Friedman A, Seidmann S, Soreq H.** (1998) Acute stress facilitates long-lasting changes in cholinergic gene expression. *Nature* 393: 373-377.

**Kawashima K, Fujii T.** (2008) Basic and clinical aspects of non-neuronal acetylcholine: overview of non-cholinergic systems and their biological significance. *J Pharmacol Sci* 106: 167-173.

**Kimbell LM, Ohno K, Engel AG, Rotundo RL.** (2004) C-terminal and heparin-binding domains of collagenic tail subunit are both essential for anchoring acetylcholinesterase at the synapse. *J Biol Chem* 279: 10997-11005.

**Klapproth H, Reinheimer T, Metzen J, Münch M, Bittinger F, Kirkpatrick CJ, Höhle KD, Schemann M, Racke K, Wessler I.** (1997) Non-neuronal acetylcholine, a signalling molecule synthesized by surface cells of rat and man. *Nauyn Schmiedbergs Arch Pharmacol* 335: 525-523.

**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): 1113-1121.

**Koelle GB.** (1950) The histochemical differentiation of types of cholinesterases and their localisation in tissues of the cat. *J Pharm Exp Ther* 100: 158-179.

**Koga Y, Satoh S, Sodeyama N, Hashimoto Y, Yanagisawa T, Hirshman CA.** (1992). Role of acetylcholinesterase in airway epithelium-mediated inhibition of acetylcholin-induced concentration of guinea-pig isolated trachea. *Eur J Pharmacol* 220: 141-146.

**Kotelevets L, Walch L, Chastre E, Chatonnet A, Dulmet E, Brink C, Norel X.** (2005) Cholinesterase activity in human pulmonary arteries and veins: correlation with mRNA levels. *Life Sci* 76: 2211-2220.

**Kordik P, Bülbring E, Burn JH.** (1952) Ciliary movement and acetylcholine. *Brit J Pharmacol* 7: 67-79.

**Kummer W, Wiegand S, Akinci S, Wessler I, Schinkel AH, Wess J, Koepsell H, Haberberger RV, Lips KS.** (2006) Role of acetylcholine and polyspecific cation transporters in serotonin-induced bronchoconstriction in the mouse. *Respir Res* 7: 65.

**Kurosawad H, Wang CG, Dandurand RJ, King M, Eidelman DH.** (1995) Mucociliary function in the mouse measured in explanted lung tissue. *J Appl Physiol* 79: 41-46.

**Lee RMKW, Forrest JB.** (1997) Structure and function of cilia, in: *The Lung*, Raven, Philadelphia, 1: 459-478.

**Legay C, Huchet M, Massoulié J, Changeux JP.** (1995) Development regulation of acetylcholinesterase transcripts in the mouse diaphragm: alternative splicing and focalization. *Eur J Neurosci* 7: 1803-1809.

**Lein PJ, Fryer AD.** (2005) Organophosphorus insecticides induce airway hyperreactivity by decreasing neuronal M2 muscarinic receptor function independent of acetylcholinesterase inhibition. *Toxicol Sci* 83: 166-176.

**Li B, Duysen EG, Carlson M, Lockridge O.** (2008) The butyrylcholinesterase knockout mouse as a model for human butyrylcholinesterase deficiency. *Pharmacol Exp Ther* 324: 1146-1154.

**Li B, Duysen EG, Saunders TL, Lockridge O.** (2006) Production of the butyrylcholinesterase knockout mouse. *JMN* 30: 1-4.

**Li B, Stribley JA, Ticu A, Xie W, Schopfer LM, Mammond P, Brimijoin S, Hinrichs SH, Lockridge O.** (2000) Abundant tissue butyrylcholinesterase and its possible function in the acetylcholinesterase knockout mouse. *J Neurochem* 75: 1320-1331.

**Li Y, Camp S, Rachinsky TL, Getman D, Taylor P.** (1991) Gene structure of mammalian acetylcholinesterase. Alternative exons dictate tissue-specific expression. *J Biol Chem* 266: 23083-23090.

**Li Y, Camp S, Taylor P.** (1993) Tissue-specific and alternative mRNA processing of the mammalian acetylcholinesterase gene. *J Biol Chem* 268: 5790-5797.

**Liao J, Heider H, Sum MC, Brodbeck U.** (1992) Different glycosylation in acetylcholinesterase from mammalian brain and erythrocytes. *J Neurochem* 58: 1230-1238.

**Lindken R, Rossi M, Ekeberg I, Vennemann P, Hierck BP, Westerweel J.** (2006) In vitro Messung der Wandschubspannungsverteilung auf einer Endothel Zellschicht mittels Micro Particle Image Velocimetry ( $\mu$ PIV). *J Exp Biol* 57: 239-259.

**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 from bronchial epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 33: 79-88.

**Lockridge O, Masson P.** (2000) Pesticides and susceptible populations: People with butyrylcholinesterase genetic variants may be at risk. *Neurotoxicology* 21: 113-126.

**Loewi O.** (1921) Über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung. *Pflügers Arch* 189: 239-242.

**Loewi O, Navratil.** (1926) Über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung. X. Mitteilung über das Schicksal des Vagusstoff. *Pflügers Arch* 214: 678-688.

**Machemer H.** (1972) Ciliary Activity and the origin of the metachrony in paramecium: effects increased viscosity. *J Exp Biol* 57: 239-259.

**Mallender WD, Szegletes T, Rosenberry TL.** (2000) Acetylcholine binds to asp74 at the peripheral site of human acetylcholinesterase as the first step in the catalytic pathway. *Biochemistry* 39: 7753-7763.

**Mannino DM, Homa DM, Akinbami LJ, Moorman JE, Gwynn C, Redd SC.** (2002) Surveillance for asthma – United States, 1980-1999. *MMWR Surveill Summ* 51: 1-13.

**Massoulié J, Bon S.** (1982) The molecular forms of cholinesterase and acetylcholinesterase in vertebrates. *Annu Rev Neurosci* 5: 57-106.

**Mitchell RW, Kelly E, Leff AR.** (1991) Reduced activity of acetylcholinesterase in canine tracheal smooth muscle homogenates after active immune-sensitization. *Am J Respir Cell Mol Biol* 5: 56-62.

**Morikawa Y, Donahoe PK, Hendren WH.** (1978) Cholinergic nerve development of fetal lung in vitro. *J Pediatr Surg* 13: 653-661.

**Morris D.** (1965) The choline acetyltransferase of human placenta. *Biochem J* 98: 754-762.

**Murphy TM, Mitchell RW, Phillips IJ, Leff AR.** (1991) Ontogenic expression of acetylcholinesterase activity in trachealis of young swine. *Am J Physiol* 261: L322-6.

**Nachmansohn D, Machado AL.** (1943) The formation of acetylcholin. A new enzyme choline acetylase. *J Neurophysiol* 6: 397-403.

**Norel X, Angrisani M, Labat C, Gorene I, Dulmet E, Rossi F, Brink C.** (1993) Degradation of acetylcholine in human airways: role of butyrylcholinesterase. *Br J Pharmacol* 108: 914-919.

**Ohru T, Sekizawa K, Yamauchi K, Ohkawara Y, Nakazawa H, Aikawa T, Sasaki H, Takishima T.** (1991) Chemical oxidant potentiates electrically and acetylcholine-induced concentration in rat trachea: possible involvement of cholinesterase inhibition. *J Pharmacol Exp Ther* 259: 371-376.

**Partanen M, Laitinen A, Hervonen A, Toivanen M, Laitinen LA.** (1982) Catecholamine- and acetylcholinesterase-containing nerves in human lower respiratory tract. *Histochemistry* 76: 175-188.

**Pavelka M, Ronge HR, Stockinger G.** (1976) Vergleichende Untersuchung am Trachealepithel verschiedener Säuger. *Acta Anat* 94: 262-282.

**Perrier AL, Cousin X, Boschetti N, Haas R, Chatel JM, Bon S, Roberts WL, Pickett SR, Massoulié J, Rosenberry TL, Krejci E.** (2000) Two distinct proteins are associated with tetrameric acetylcholinesterase on the cell surface. *J Biol Chem* 275: 34260-34265.

**Perrier AL, Massoulié J, Krejci E.** (2002) PRIMA: The membrane anchor of acetylcholinesterase in the brain. *Neuron* 33: 275-285.

**Proskocil BJ, Bruun DA, Lorton JK, Blensley KC, Jacoby DB, Lein PJ, Fryer AD.** (2008) Antigen sensitization influences organophosphorus pesticide-induced airway hyperreactivity. *Envir Health Perspectives* 116: 381-388.

**Proskocil BJ, Sekhon HS, Jia Y, Savchenko V, Blakely RD, Lindstrom J, Spindel ER.** (2004) Acetylcholine is an autocrine or paracrine hormone synthesized and secreted by airway bronchial epithelial cells. *Endocrinology* 145: 2498-2506.

**Robertson RT, Yu J.** (1993) Acetylcholinesterase and neural development: New tricks for an old dog? *News Physiol Sci* 8: 266-272.

**Rosenberry TL** (1975) Acetylcholinesterase. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 43: 103-218.

**Rossi M, Ekeberg I, Vennemann P, Lindken R, Westerweel J, Hierck BP, Tomasini EP.** (2006) In vitro study of shear stress over endothelial cells by Micro Particle Image Velocimetry ( $\mu$ PIV). 13<sup>th</sup> Int Symp on Applications of Laser Techniques to Fluid Mechanics, paper 14.4, Lisbon, Portugal, June 26-29.

**Sadé J, Eliezer N, Silberberg A, Nevo AC.** (1970) The role of mucus in transport by cilia. *Am Rev Respir Dis* 102: 48-52.

**Sastry BVR.** (1997) Human placental cholinergic system. *Biochem Pharmacol* 53: 1577-1586.

**Sastry BVR, Sadavongvivad C.** (1979) Cholinergic systems in non-nervous tissues. *Pharmacological Reviews* 30: 65-132.

**Schlereth T, Birklein F, an Haack K, Schiffmann S, Kilbinger K, Kirkpatrick CJ, Wessler I.** (2006) In vivo release of non-neuronal acetylcholine from the human skin by dermal microdialysis: effect of botulinum toxin. *Br J Pharmacol* 147: 183-187.

**Schlereth T, Schönefeld S, Birklein F, Kirkpatrick CJ, Wessler I.** (2007) In vivo release of non-neuronal acetylcholine from the human skin by dermal microdialysis: effects of sunlight, UV-A and tactile stimulus. *Life Sci* 80: 2239-2242.

**Schmidt G, Schmidt M, Nenner M, Vetterlein F.** (1979) Effects of dichlorvos (DDVP) inhalation on the activity of acetylcholinesterase in the bronchial tissue of rats. *Arch Toxicol* 42: 191-198.

**Schneeberger EE, Lynch RD.** (1997) Chapter: Airway and alveolar epithelial cell junctions, in: *The Lung*, Raven, Philadelphia 1: 505-515.

**Senthilselvan A, McDuffie HH, Dosman JA.** (1992) Association of asthma with use of pesticides. Results of a cross – sectional survey of farmers. *Am Rev Respir Dis* 146: 884-887.

**Simon S, Krejci E, Massoulié J.** (1998) A four-to-one association between peptide motifs: four C-terminal domains from cholinesterase assemble with one proline-rich attachment domain (PRAD) in the secretory pathway. *EMBO J* 17: 6178-6187.

**Sleigh MA, Blake JR, Liron N.** (1988) The propulsion of mucus by cilia. *Am Rev Respir Dis* 137: 726-741.

**Small RC, Good DM, Dixon JS, Kennedy I.** (1990). The effects of epithelium removal on the actions of cholinomimetic drugs in opened segments and perfused tubular preparations of guinea-pig trachea. *Br J Pharmacol* 100: 516-522.

**Soreq H, Aziz B, Prody CA, Seidmann S, Gnatt A, Neville L, Lieman-Hurwitz J, Lev-Lehman E, Glinzberg D, Lipidot-Lifson Y, Zakut H.** (1990) Molecular cloning and construction of the coding region for human acetylcholinesterase reveals a G+C-rich attenuating structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 9688-9692.

**Starke K.** (1996) Kapitel: Grundlagen der Pharmakologie des Nervensystems, in: *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, Spektrum, Heidelberg: 112-115.

**Sussman JL, Harel M, Frolov F.** (1992) Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*. A prototypic acetylcholine-binding protein. *Science* 253: 872-878.

**Taylor P, Radic Z.** (1994) The cholinesterases: from genes to proteins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 34: 281-320.

**Thullberg MD, Cox HD, Schule T, Thompson CM, George KM.** (2005) Differential localization of acetylcholinesterase in neuronal and non-neuronal cells. *J Cell Biochem* 96: 599-610.

**Urban und Fischer.** (2005). Acetylcholinesterase-Hemmer. Roche Lexikon Medizin. 5. Auflage. 12.

**Urban und Fischer.** (2005). Physiostymin. Roche Lexikon Medizin. 5. Auflage. 1461.

**Usdin TB, Eiden LE, Bonner TI, Erickson JD.** (1995) Molecular biology of the vesicular ACh transporter. *Trends Neurosci* 18: 218-224.

**Wang H, Man Y, Ochani M, Amella CA, Tanovic M, Susaria S, Li JH, Wang J, Yang J, Ulloa L, Al-Abed, Y, Czura CJ, Tracey KJ.** (2003) Nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha 7$  subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature* 421: 384-388.

**Wanner A, Salathé M, O’Riordan TG.** (1996) Mucociliary clearance in the airways. *Am J Respi Crit Care Med* 154: 1868-1902.

**Welsch U.** (2003) Kapitel 8: Atmungsorgane, in: Lehrbuch Histologie. Urban & Fischer Verlag, München: 278-280.

**Wessler I, Kirkpatrick CJ.** (2001) The non-neuronal cholinergic system: an emerging drug target in the airways. *Pulm Pharmacol Ther* 14:423-434.

**Wessler I, Kirkpatrick CJ, Racke K.** (1998) Non-neuronal acetylcholine, a locally acting molecule, widely distributed in biological systems: Expression and function in humans. *Pharmacol Ther* 77: 59-79.

**Wessler I, Kirkpatrick CJ, Racke K.** (1999) The cholinergic “pitfall”: acetylcholine, a universal cell molecule in biological systems, including humans. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26: 198-205.

**Wessler I, Kilbinger H, Bittinger F, Kirkpatrick CJ.** (2001) The biological role of non-neuronal acetylcholine in plants and humans. *Jpn J Pharmacol* 85: 2-10.

**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: 2055-2061.

**Whittaker M** (1986) Cholinesterase. *Monogr Hum Genet.* Basel, Karger 11: 132.

**Whittaker VP.** (1963) Identification of acetylcholine and related esters of biological origin. *Handbuch der experimentellen Pharmakologie*, Springer, Berlin, Heidelberg, New York 15: 1-39.

**Willbold E, Layer PG.** (1994) Butyrylcholinesterase regulates laminar retinogenesis of the chick embryo in vitro. *Eur J Cell Biol* 64: 192-199.

**Xie W, Stribley JA, Chatonnet A, Wilder PJ, Rizzino A, McComb RD, Tylor P, Hinrichs SH, Lockridge O.** (2000) Postnatal development delay and supersensitivity to organophosphate in gene-targeted mice lacking acetylcholinesterase. *J Pharmacol Exp Ther* 293: 896-902.

**Zhang L, Han DM, Wang H, Zhou B, Sanderson MJ.** (2004) Measurement of respiratory ciliary beat frequency quantified with high-speed digital microscopy. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi* 39: 433-437.



## 9 Danksagung

Zum Abschluss meiner Arbeit möchte ich mich ganz besonders bei Wolfgang Kummer für das Thema und das Ermöglichen dieser wissenschaftlichen Arbeit bedanken. Er hat mit seinen wertvollen, fachlich fundierten und konstruktiven Ratschlägen für das Gelingen dieser Arbeit gesorgt.

Möglich war das Ganze nur aufgrund der sagenhaften Betreuung von Katrin Lips nicht nur während der Versuchsreihen, sondern auch während der Schreibphase. An dieser Stelle möchte ich mich in ganz besonderer Weise bei dir bedanken. Du hast diese Arbeit mit deinen Ideen, deiner Geduld, konstruktiver Kritik und vielen fruchtbaren Diskussionen immer wieder vorangetrieben. Du hattest stets ein offenes Ohr für alle anfallenden Probleme und zuversichtliche, aufmunternde Worte sowie hilfreiche Verbesserungsvorschläge für mich parat. Danke für deine sehr gute Betreuung und fortwährende Unterstützung.

Es hätte sicherlich nur halb so viel Spaß gemacht, wenn ich nicht während des praktischen Teils nette Helfer an meiner Seite gehabt hätte. Großer Dank gebührt dem gesamten Team der Anatomie für die tatkräftige Unterstützung, sei es im Labor, beim Statistik- und Excel-Kampf am PC oder bei der spaßigen Pausengestaltung. Ihr habt immer für Abwechslung gesorgt. Danken möchte ich hier im Besonderen Meike, Martin, Silke, Petra F., Petra H., Tamara, Carola, Frau Berger und all denen, die in irgendeiner Form am Gelingen dieser Arbeit beteiligt waren.

Ein weiterer Dank geht an meine Kollegin und Freundin Teresa. Ohne dich wäre diese Arbeit nie ins Rollen gekommen und die Wochenenden / Nächte während der Versuche wären noch endloser gewesen. Du hast mich nicht nur tatkräftig unterstützt, sondern mich stets aufgebaut und für die erforderliche Abwechslung gesorgt.

Danke sagen möchte ich auch meinem Patenonkel Andreas für seine tatkräftige Unterstützung in den letzten Zügen der Arbeit.

Besonders danken möchte ich meinem Freund Maik, der die Zeit meiner überstrapazierten Nerven überstanden hat. Du hast mir immer den Rücken freigehalten und mir tatkräftig zur Seite gestanden. Ohne dich hätte ich bei der Gestaltung der Arbeit nie ein Licht am Ende der Doktorarbeit gesehen und dafür möchte ich dir danken.

Abschließend gilt ein riesiger Dank meinen Eltern und Großeltern, ohne die mein Studium und meine Doktorarbeit niemals möglich gewesen wären. Ich danke euch für eure unermessliche Unterstützung und euren grenzenlosen Rückhalt in jeder Lebenslage. Danke, dass ihr immer an mich geglaubt habt und aus diesem Grund widme ich euch diese Doktorarbeit.

## 10 Eidesstattliche Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, 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.“