
**Einfluss von IL-13 auf die mukoziliäre Funktion
gemessen an kultivierten Sphäroiden des nasalen
Epithels von gesunden Spendern und ihre
Stimulierbarkeit mit ATP**

Sabine Raith

Aus der medizinischen Klinik Innenstadt der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

**Einfluss von IL-13 auf die mukoziliäre Funktion gemessen an kultivierten
Sphäroiden des nasalen Epithels von gesunden Spendern und ihre
Stimulierbarkeit mit ATP**

Dissertation
zum Erwerb des Dokortitels der Zahnmedizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Sabine Raith

aus Landshut

Jahr

2011

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Rudolf M. Huber

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Andreas Leunig

Prof. Dr. Carl-Peter Cornelius

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. F. Gamarra

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 26.07.2011

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1 Die mukoziliäre Funktion	1
1.2 Das Sphäroid-Modell	2
1.3 Die Bedeutung von IL-13 für das respiratorische Epithel	2
1.4 Die Bedeutung von ATP für die mukoziliäre Funktion	3
1.5 Fragestellung	5

2. Materialien und Methoden

2.1 Herstellung der Grundmedien	
2.1.1 Herstellung des Zellkulturmediums	6
2.1.2 Herstellung von Dulbecco`s Modified Eagle Medium für die Messungen	7
2.2 Kultivierung der Sphäroide	
2.2.1 Gewinnung von Nasalepithel	7
2.2.2 Kultivierung des nasalen respiratorischen Epithels	7
2.2.3 Beurteilung der entstandenen Sphäroide	9
2.3 Bestimmung der mukoziliären Funktion	
2.3.1 Versuchsaufbau	11
2.3.2 Bestimmung der Rotationsfrequenz und Rotationsgeschwindigkeit	12
2.4 Versuchsprotokoll: Versuche mit Nasalepithel-Sphäroiden gesunder Probanden nach Inkubation mit und ohne IL-13 in unterschiedlichen Konzentrationen und Stimulation durch γ -ATP	14
2.5 Statistik	15

3. Ergebnisse

3.1 Kultur der Sphäroide ohne IL-13, mit 50ng/ml IL-13 und 100 ng/ml IL-13	
3.1.1 Anzahl der Sphäroide in den verschiedenen Gruppen	16
3.1.2 Anzahl der rotierenden Sphäroide in den verschiedenen Gruppen	17
3.1.3 Vergleich der Durchmesser der rotierenden Sphäroide in den verschiedenen Gruppen	19
3.2 Vergleich der Rotationsgeschwindigkeiten der Kontrollgruppe mit den Gruppen 50ng/ml und 100 ng/ml IL-13	

Inhaltsverzeichnis

3.2.1	<i>Basale Geschwindigkeit in den drei Gruppen</i>	21
3.2.1.1	Variabilität der basalen Geschwindigkeit in den drei Gruppen	21
3.2.1.2	Vergleich zwischen den drei Gruppen zum Zeitpunkt -30s bzw. ihrer Maximalwerte	22
3.2.2	<i>Geschwindigkeit nach γ-ATP-Zugabe in den drei Gruppen</i>	26
3.2.2.1	Verlauf	26
3.2.2.2	Maximalwerte der drei Gruppen	29
3.2.3	<i>Änderung der maximalen Geschwindigkeit in den drei Gruppen nach γ-ATP-Stimulation</i>	30
3.3	Zusammenfassung der Ergebnisse	32
4.	Diskussion	
4.1	Diskussion der Materialien und Methoden	
4.1.1	<i>Diskussion des Sphäroid-Modells</i>	33
4.1.2	<i>Kultur von Nasalepithel-Sphäroiden</i>	34
4.1.3	<i>Versuchsaufbau und Messung der mukoziliären Funktion</i>	34
4.1.4	<i>Diskussion der Wirkungen von γ-ATP und IL-13</i>	
4.1.4.1	γ -ATP	35
4.1.4.2	Interleukin-13	36
4.2	Diskussion der Ergebnisse	
4.2.1	<i>Kultur von Nasalepithel-Sphäroiden gesunder Probanden</i>	37
4.2.2	<i>Diskussion der Ergebnisse der drei Versuchsgruppen</i>	37
5.	Zusammenfassung	
5.1	Ziele	39
5.2	Zusammenfassung der Ergebnisse	40
5.3	Schlussfolgerung	40
5.4	Zukünftige Fragestellungen	40
6.	Abkürzungen	42
7.	Literaturverzeichnis	43

8. Danksagung	46
----------------------	----

1. Einleitung

1. Einleitung

In den hier beschriebenen Versuchen sollte untersucht werden, ob die mukoziliäre Transportgeschwindigkeit von kultivierten humanen Nasalepithel-Sphäroiden normaler Spender und ihre Stimulierbarkeit mit γ -ATP durch Interleukin-13 beeinflusst wird. Hierbei wurden zwei verschiedene Konzentrationen von IL-13 und eine Kontrollgruppe ohne Inkubation mit IL-13 verwendet. Um die mukoziliäre Funktion beurteilen zu können, wurde die Rotationsfrequenz der Sphäroide gemessen und verglichen.

Auf diese Versuchsmethode und die Bedeutung von IL-13 und γ -ATP auf das respiratorische Epithel wird in diesem Kapitel eingegangen.

1.1 Die mukoziliäre Funktion

Die mukoziliäre Funktion stellt einen angeborenen Abwehrmechanismus dar, der die Luftwege vor Bakterien, Toxinen und Schmutzpartikel schützen soll (11,15). Ist diese Funktion gestört, führt dies vor allem zu einer Einschränkung der pulmonalen Funktion und zu einem steigenden Risiko an Zweitinfektionen zu erkranken (11).

Die Oberflächenschicht der Luftwege setzt sich aus zwei Komponenten zusammen: einer mukösen und einer periziliären flüssigen Schicht (15,20). Die Effektivität der mukoziliären Funktion ist abhängig von dem Zusammenspiel der Zilien mit dem darüberliegenden Mukus (15). Dabei ist es wichtig, dass benachbarte Zilien synchron in die gleiche Richtung schlagen, welche durch die Orientierung der zentralen Mikrotubuli festgelegt ist (12). Aber nicht nur die Schlagfrequenz, sondern auch die Zusammensetzung des Mukus spielt eine wesentliche Rolle (15). Seine Viskoelastizität ist hierbei von großer Bedeutung (15). Je visköser und dicker die muköse Schicht ist, desto geringer ist die ziliäre Transportrate (13).

Ein Schlagzyklus setzt sich aus drei Phasen zusammen (22). Während der Ruhephase liegen die Zilien annähernd parallel zur Zelloberfläche, in die Transportrichtung zeigend. In der zweiten Phase bewegen sie sich rückwärts, um für den darauffolgenden Schlag in der letzten Phase auszuholen. Dabei maximieren die Zilien ihr Gewicht und ihre Geschwindigkeit, um den darüberliegenden Mukus in der dritten Phase anzutreiben (22). Setzt dieser Mechanismus aus bzw. ist er überlastet, wird der Mukus mittels Husten aus den Luftwegen abtransportiert (13,15).

1. Einleitung

Die ziliäre Schlagfrequenz ist abhängig von Kalziumoszillationen, kann aber auch durch andere Substanzen, wie z.B. ATP beeinflusst werden (7,8).

1.2 Das Sphäroid-Modell

Bei dem in diesen Versuchen verwendeten Sphäroid-Modell wurde durch einen nasalen Bürstenabstrich respiratorisches Epithel entnommen und anschließend in flüssigem Medium kultiviert. Die abgebürsteten Epithelproben lagern sich nach einigen Tagen zu kugelförmigen Gebilden zusammen. Da die Zilien auf der Oberfläche synchron in eine Richtung schlagen, sind die Sphäroide in der Lage, um ihre eigene Achse zu rotieren. In den folgenden Versuchen stellt die Rotationsgeschwindigkeit den Parameter für die mukoziliäre Funktion dar.

1.3 Die Bedeutung von IL-13 für das respiratorische Epithel

IL-13 ist ein pleiotropes Zytokin der TH2-Immunantwort (3,5). Es wird von Mastzellen, aktivierten T-Lymphozyten, insbesondere TH2-Lymphozyten, und basophilen Granulozyten produziert (3). Hierbei ist es bei der Gegenregulierung der TH1-Immunantwort wichtig und schützt weiterhin vor Ektoparasiten und gastrointestinalen Würmern (9). Ein Überangebot von IL-13 hat eine Entzündungsreaktion und Überproduktion von Mukus, ebenso wie einen fibrotischen Umbau der Luftwege und eine erhöhte Resistance zur Folge (25,27). Weitere Effekte in Monozyten und B-Zellen sind die Förderung der Expression von MHC II-Molekülen, Class-switch zur IgE-Produktion und die Hemmung der entzündlichen Zytokinproduktion (16,27). Interleukin-13 spielt auch für die Entstehung von allergischem Asthma, allergischer Rhinitis und chronischer Sinusitis eine Rolle, da es die eosinophile Entzündungsreaktion, die Mukussekretion und die Atemwegs-Hyperreagibilität reguliert (4,25,27). Die erhöhte Schleimproduktion ist auf eine Hyperplasie und Metaplasie der Mukosazellen durch IL-13 zurückzuführen (25,27).

Die Wirkung von IL-13 auf die Zielzelle wird über einen IL-13 Rezeptor vermittelt, welcher dem IL-4-Rezeptor ähnelt. Beide Rezeptoren besitzen die gleiche Untereinheit (28). Auch sind diese Zytokine ähnlich aufgebaut, was ihre überlappenden Funktionen erklärt. Beide

1. Einleitung

spielen beispielsweise bei erworbenen Lungenerkrankungen eine Rolle (11,23). Eine erhöhte Anzahl von IL-13-Rezeptoren liegt in Zellen des nasalen respiratorischen Epithels von Allergikern vor (1). Es wird aber auch vermutet, dass IL-13 direkt auf das respiratorische Epithel einwirken und so die Mukusproduktion erhöhen kann (14).

Weiterhin stimuliert Interleukin-13 nicht nur die Differenzierung der Becherzellen, sondern hemmt auch die Ziliogenese (18).

Die Feststellung, dass IL-13 also zu einem Verlust des Flimmerepithels führt und die ziliäre Schlagfrequenz erniedrigt (11,18), führt zur Annahme, dass das Zytokin auch einen Einfluss auf die mukoziliäre Funktion der Nase nimmt.

1.4 Die Bedeutung von ATP für die mukoziliäre Funktion

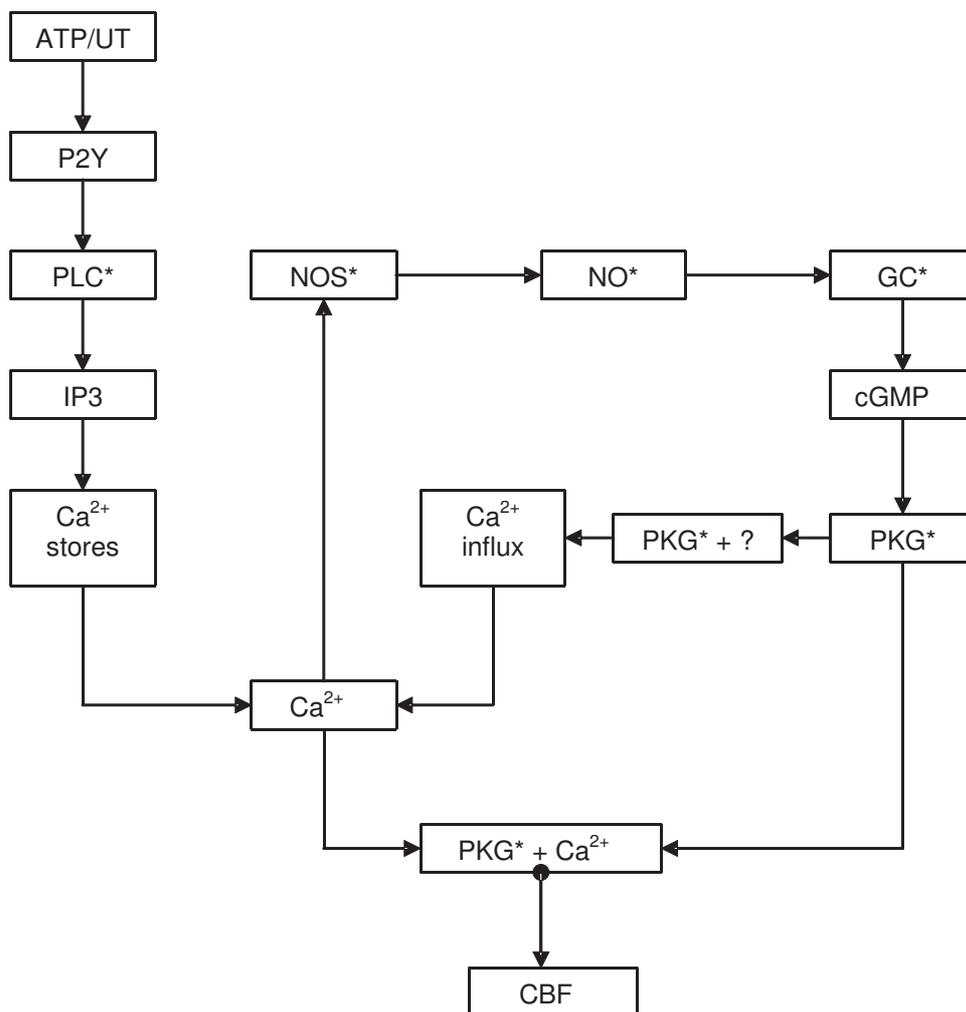
Adenosintriphosphat (ATP) ist ein extrazelluläres Nukleotid, welches von Nervenzellen, chromaffinen Zellen, Mastzellen, und zirkulierenden Thrombozyten ausgeschüttet wird (19). Es reguliert ein breites Spektrum zellulärer Immunantworten, wie beispielsweise Zellproliferation, Kontraktion von Herzmuskel- und Skelettmuskelzellen, und die mukoziliäre Funktion (19). Es wird angenommen, dass die Freisetzung von ATP der mechanischen Stimulation von Epithelzellen, Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Gliazellen, Fibroblasten und Hepatozyten unterliegt (19). Diese Stimulation kann unter anderen durch Scherbeanspruchung, Dehnung oder durch ein hypotones Medium ausgelöst werden (19). Die mukoziliäre Funktion wird durch ATP gesteigert, indem es die Schlagfrequenz der Zilien, die Chlorid- und Wassersekretion, und die Degranulation der Becherzellen erhöht (6,21). ATP führt über den Purinorezeptor P2Y zu einem schnellen und großen Anstieg von Kalziumionen aus intrazellulären Speichern (24). Der P2Y-Rezeptor aktiviert die Phospholipase C, die wiederum IP3 und DAG produziert (24). IP3 leitet die Freisetzung von Kalzium ein, während DAG die Phosphokinase C freischaltet (24). Ebenso ist NO an der Signaltransduktion beteiligt (24). Der erhöhte Kalziumspiegel führt zur Aktivierung der NO-Synthetase, die über NO und Proteinkinase G den Kalziumzufluss erhöht (24). Die Kalziumkonzentration steigt bis zu 300 nmol/l an (7). Wie genau das Kalzium auf die Zilien einwirkt ist nicht bekannt, aber man vermutet, dass Calmodulin hier eine Rolle spielt (7). Weiterhin nimmt man an, dass ein Kalziumzufluss in die ziliären Zellen auch über den Purinorezeptor P2X möglich wäre, da dieser durchlässig für Kalziumionen ist (17). Ebenso

1. Einleitung

besteht die Möglichkeit, dass extrazelluläres ATP indirekt die Kalzium-Kanäle durch Depolarisation der Zellmembrane aktiviert (17).

ATP verbessert also die mukoziliäre Funktion, da es einerseits die ziliäre Schlagfrequenz erhöht, und sich andererseits die Zusammensetzung des Mukus durch die gesteigerte Wasser- und Chloridsekretion positiv auswirkt.

Quelle (24) [CBF = ziliäre Schlagfrequenz]



1. Einleitung

1.5 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss von Interleukin-13 auf die mukoziliäre Funktion gemessen an kultivierten Sphäroiden des nasalen Epithels von normalen Spendern und ihre Stimulation von γ -ATP untersucht werden. Im Rahmen dieser Untersuchung stellten sich folgende Fragen:

1. Hat IL-13 einen Einfluss auf die Kultur von Nasal-Epithelsphäroiden?
2. Wie wirkt sich die Kultur mit IL-13 auf die basale oder stimulierte Rotationsfrequenz der Nasalepithel-Sphäroide aus?
3. Welchen Einfluss haben die unterschiedlichen Konzentrationen von IL-13 auf die Nasalepithel-Sphäroide?
4. Welchen Einfluss hat γ -ATP auf die Rotationsfrequenz der unterschiedlich kultivierten Nasalepithel-Sphäroide?

2. Materialien und Methoden

2.1. Die Herstellung von Grundmedien

Nun werden die Grundlagen zur Herstellung der Kultur erläutert. Die folgenden Arbeitsschritte für diese Herstellung erfolgten unter sterilen Bedingungen und unter einem Arbeitsplatzabzug.

2.1.1 Herstellung des Zellkulturmediums

In 500 ml Airway Promo Cell Grundlösung (Airway Epithelial Cell Growth Medium, Promo Cell, Heidelberg Deutschland) wurde der Inhalt der vom Hersteller mitgelieferten Supplement-mix-Packung gegeben. Daraus wurden 45 ml entnommen und hierzu

5ml NCS-Serum (neugeborenes Kälberserum; NCS, Gibco, Invitrogen Corporation, Paisley, Schottland)

110µl Penstrep (Antibiotika: Penicillin, Streptomycin; Penstrep 10µl/ml, Gibco, Invitrogen Corporation, Paisley, Schottland)

200µl Fungizone (Antimykotikum Amphotericin B, 1µg/ml, Gibco, Invitrogen Corporation, Paisley, Schottland)

gegeben.

Dieses Medium wurde für die Kultur der Sphäroide verwendet. Weiterhin wurde das Medium auch für die Zusammenstellung der IL-13 Konzentrationen von 50ng/ml und 100ng/ml benötigt. Eine Stammlösung von Interleukin-13 mit der Konzentration 1mg/ml wurde vorbereitet und entsprechend der Herstellerangaben tiefgefroren. Wir verwendeten humanes Interleukin-13 der Firma Sigma-Aldrich GmbH, Bestellnummer I1771. Um eine Konzentration von 50ng/ml zu erreichen, wurden 100µl IL-13 der Konzentration 1mg/ml mit 1900µl Medium vermengt. Für die Herstellung von 100ng/ml IL-13 wurden 100µl IL-13 der Konzentration 1mg/ml mit 900µl Medium gemischt.

2. Materialien und Methoden

2.1.2 Herstellung von Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM) für die Messungen

Die DMEM-Lösung (Dulbecco`s Modified Eagle Medium; PAA Laboratories, Pasching, Österreich) beinhaltet L-Glutamin und 25mM HEPES Puffer. Sie wurde zur Herstellung von γ -ATP der Konzentration 500mMol/l und für die Versuchsdurchführung verwendet. Wir verwendeten ATP- γ -S (Adenosine 5'-[γ -thio]triphosphate tetralithium salt, Fa. Sigma-Aldrich GmbH, Bestellnummer A1388).

2.2 Kultivierung der Sphäroide

2.2.1 Gewinnung von Nasalepithel

Für die Entnahme von respiratorischem Epithel zu Forschungszwecken lag eine Genehmigung der Ethikkommission der LMU München vor.

Die Probanden haben freiwillig der Probenentnahme zugestimmt. Das respiratorische Epithel wurde mittels einer Zytologiebürste aus der Nase entnommen. Es handelte sich um eine Standardzytologiebürste, wie sie auch bei einer Bronchoskopie verwendet wird. Die Bürste wurde hierzu in den unteren Nasengang eingeführt, aus der Hülle geschoben, und vorsichtig an der Wand des Nasenganges vor und zurück bewegt. Mit dieser Methode konnten Epithelzellen und Schleim abgebürstet werden, welche anschließend in ein Röhrchen mit physiologischer Kochsalzlösung durch wiederholtes Hinein- und Herausschieben gestreift wurden.

In den folgenden Versuchen nahmen nur gesunde Spender teil. Sie durften weder Raucher sein, noch an einen respiratorischen Infekt oder Allergie leiden.

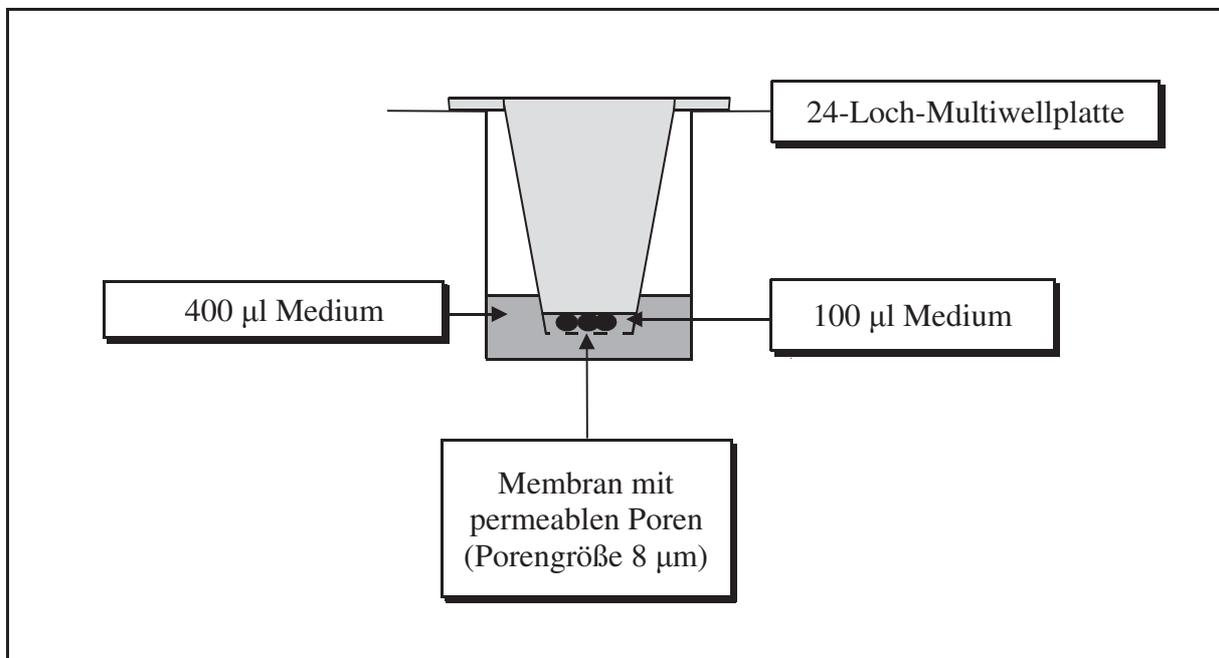
2.2.2 Kultivierung des nasalen respiratorischen Epithels

Die gewonnene Probe des nasalen Epithels, bestehend aus Schleim, Zellen und Streifen des respiratorischen Epithels, wurde auf sechs ‚transwell‘-Einsätze mit einer porösen Membran (Cellculture inserts for 24-well plates, 8 μ m, BD-Falcon, Bestellnummer 3 S 3097) verteilt. Diese Einsätze waren in einer 24-Loch-Multiwellplatte (Multiwell Tissue Culture Plate, 24 Well, Falcon™, Becton-Dickison and Company, Franklin Lakes, N.J., USA) eingebracht.

2. Materialien und Methoden

Den Aufbau eines ‚transwell‘-Einsatzes zeigt die Abbildung 2.1. Durch die enthaltene permeable Membran war eine Diffusion zwischen dem inneren Kompartiment des Wells, in welches die Probe eingebracht wurde, und dem äußerem Kompartiment möglich.

In jeweils zwei der Einsätze wurden insgesamt entweder 500µl reines Medium, oder 500µl Medium mit Interleukin-13 in den Konzentrationen 50ng/ml oder 100ng/ml hinzugefügt. Hierbei wurde jeweils 400µl der Flüssigkeit in das äußere Kompartiment pipettiert, und 100µl zu der Probe gegeben. Damit konnten zum einen die Zellen ausreichend ernährt werden, und zum anderen in wenig Flüssigkeit schwimmen. Die Einteilung erfolgte durch Randomisierung.

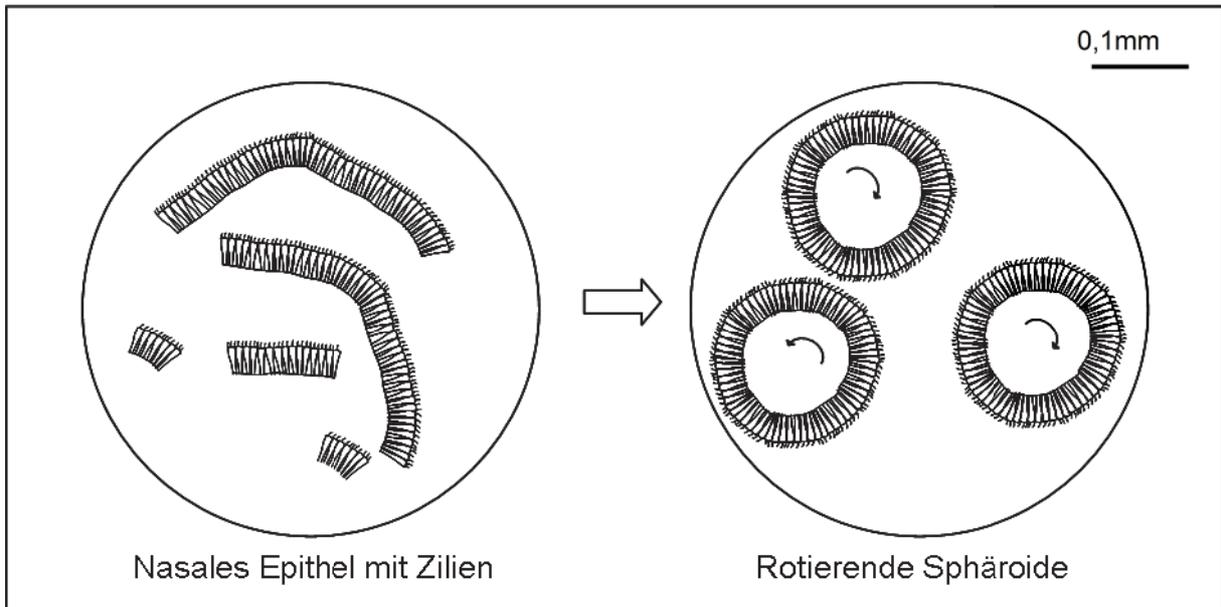


Die Abbildung 2.1 zeigt den Aufbau eines ‚transwell‘-Einsatzes in einer 24-Loch-Multiwellplatte.

Die Proben wurden anschließend im Brutschrank (HERAcell, Heraeus, Hanau, Deutschland) bei 37°C mit 5% CO₂ und annähernd 100% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Es wurde täglich kontrolliert, dass immer genügend Flüssigkeit in den Einsätzen bestehen bleibt, damit die Proben nicht austrocknen konnten, und es somit den später entstehenden Sphäroide möglich war zu rotieren. Weiterhin wurde die Flüssigkeit nach drei Tagen durch frisches Medium gegebenenfalls mit Interleukin-13 ersetzt. Dazu wurde das jeweilige Medium mittels sterilem Tupfer abgesaugt, was aufgrund der permeablen Membran der ‚transwell‘-Einsätze möglich war, und durch frisches Medium ersetzt.

2. Materialien und Methoden

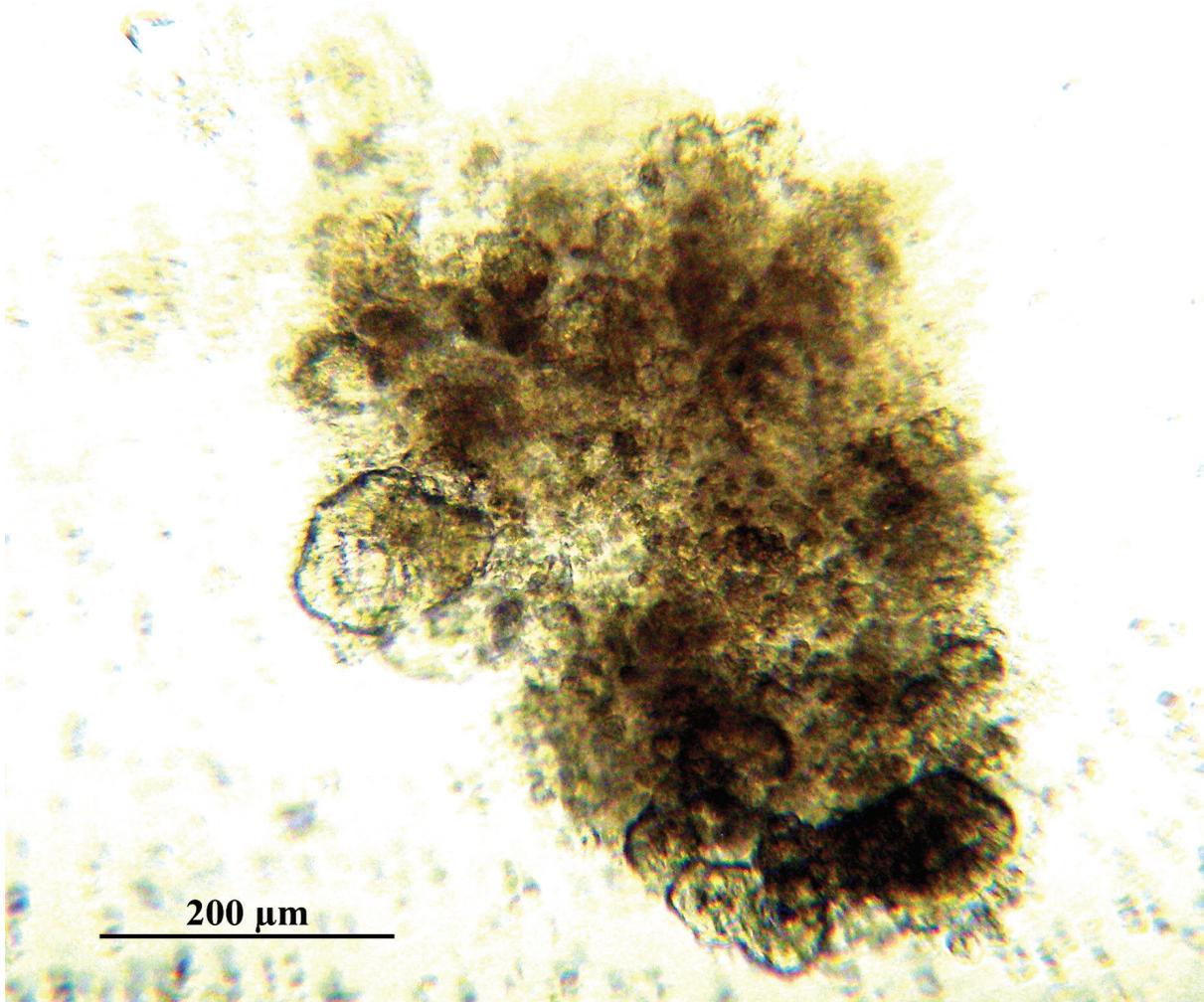
Je nach Probe entwickelten sich nach Stunden bis Tagen die ersten Sphäroide, die teilweise im umgebenden Schleim rotierten (siehe Abbildung 2.2). Die Versuche wurden am sechsten Tag nach Beginn der Kultivierung durchgeführt.



Die Abbildung 2.2 zeigt schematisch die Ausbildung von rotierenden Nasaelepipithel-Sphäroiden.

2.2.3 Beurteilung der entstandenen Sphäroide

Die Proben wurden täglich phasenkontrastmikroskopisch kontrolliert, wobei vor allem auf ausreichend Flüssigkeit in den ‚transwell‘-Einsätzen und Verunreinigungen geachtet wurde. Die entstandenen Sphäroide wurden am sechsten Tag gezählt und ihr Anteil zu den rotierenden ermittelt. Nach diesen Tagen hatten sich in der Regel genügend rotierende Sphäroide gebildet, die für die Versuche, und damit für die Bestimmung der Rotationsgeschwindigkeit verwendet werden konnten. War das bis zu diesem Zeitpunkt nicht der Fall bzw. zeigte eine Probe Verunreinigungen, so wurde die betroffene Probe verworfen.



Die Abbildung 2.3 zeigt Nasalepithel-Sphäroide im umgebenden Mukus bei der Versuchsdurchführung.

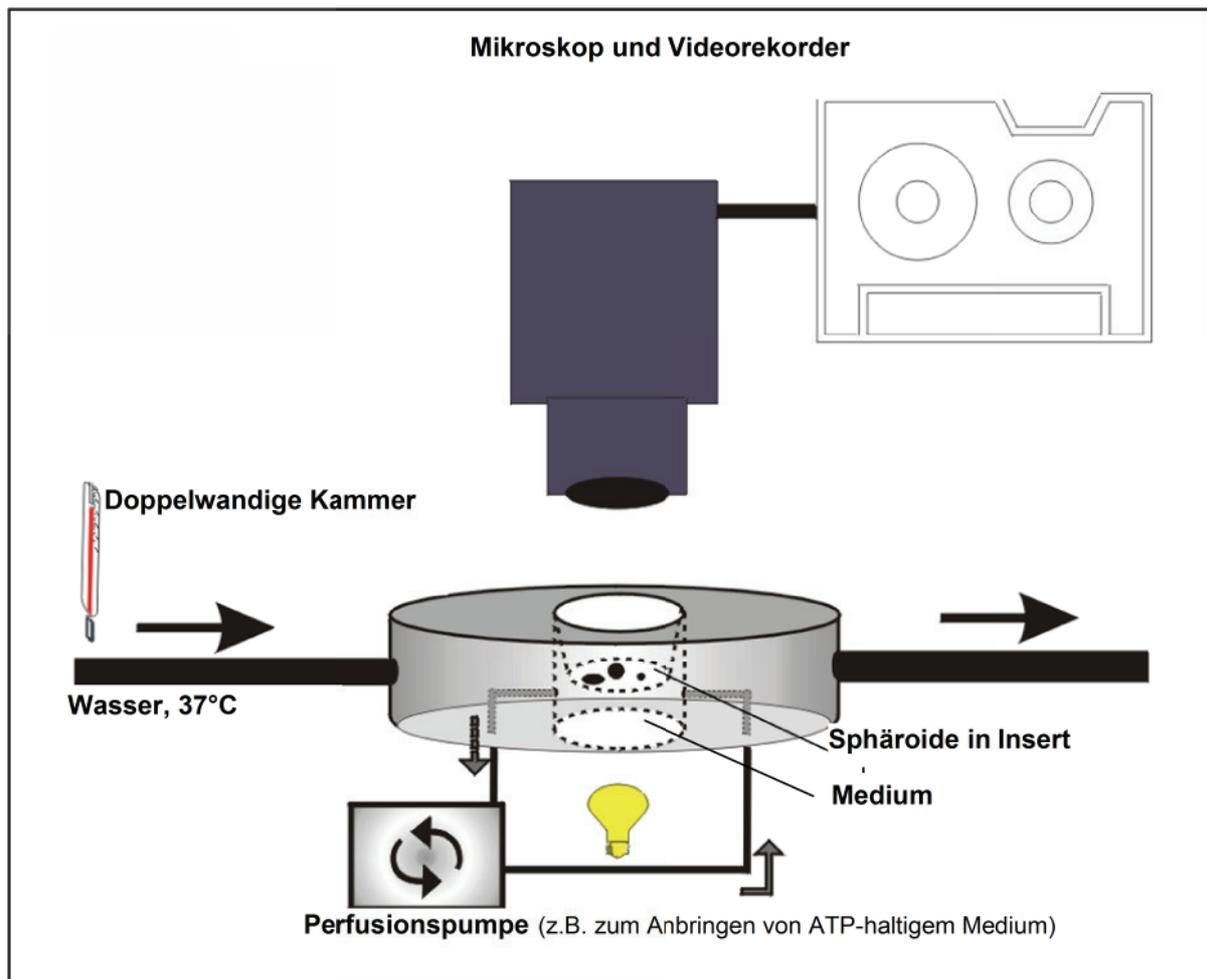
2.3 Bestimmung der mukoziliären Funktion

Da sich die kultivierten Proben des respiratorischen Epithels zu kugelförmigen Sphäroiden zusammenlagerten, waren sie in der Lage zu rotieren. Ihre Rotationsgeschwindigkeit ist, wie auch die mukoziliäre Funktion *in vivo*, abhängig von der Schlagfrequenz der Zilien und der Zusammensetzung des Mukus, und wurde daher als Parameter für die mukoziliäre Funktion verwendet.

2. Materialien und Methoden

2.3.1 Versuchsaufbau

Um die Rotationsgeschwindigkeit der kultivierten Sphäroide zu bestimmen, wurden die Proben in eine speziell angefertigte Versuchskammer gebracht. Für die Versuche waren ein Stereomikroskop mit Phasenkontrastbeleuchtung (Stemi 2000, Zeiss, Oberkochen, Deutschland), eine Kamera (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Japan), ein Fernsehbildschirm (Sony, Tokyo, Japan) und ein Videogerät mit Timer (Panasonic, Matsushita Electric Industrial Co., Osaka, Japan) miteinander angeschlossen (siehe Abbildung 2.4). Die Kammer wurde mittels Schläuche mit einem Wärmebad verbunden. Das erwärmte Wasser wurde mit einer Pumpe durch die Außenwand der Kammer gepumpt. Hierdurch konnte im Inneren der Kammer eine konstante Temperatur von 37°C gehalten werden. Über ein in der Kammer installiertes Messgerät konnte die Temperatur kontrolliert und gegebenenfalls nachreguliert werden. In dem Wasserbad wurden auch das Versuchsmedium und die γ -ATP-Lösung erwärmt, um temperaturabhängige Änderungen, die sich auf die Rotation auswirken könnten, möglichst gering zu halten. Ein zweites Schlauchsystem transportierte Medium in die Mitte der Kammer, wodurch die Probe aufgrund der permeablen Membran des Wells mit Flüssigkeit versorgt werden konnte. Zum Schutz vor Austrocknung wurde über den jeweiligen Probenbehälter ein durchsichtiges Deckgläschen gelegt. Hierdurch wurde die Sicht durch das Mikroskop, welches über der Kammer angebracht war, kaum beeinträchtigt. Das Mikroskop selbst war an ein Videogerät angeschlossen. Hiermit konnten die Rotationen der Sphäroide aufgezeichnet, und mittels Fernsehbildschirm beobachtet werden.



Die Abbildung 2.4 zeigt die Apparatur zur Messung der mukoziliären Funktion.(10)

2.3.2 Bestimmung der Rotationsfrequenz und Rotationsgeschwindigkeit

Um die Rotationsfrequenz bestimmen zu können, wurden die Versuche, also die Rotationen der Sphäroide, mit der Videokamera aufgezeichnet, und später ausgewertet. Die Zeit, die ein Sphäroid für eine Umdrehung benötigte, wurde ebenso wie der Durchmesser des jeweiligen Sphäroids gemessen.

Die Form der Sphäroide spielte dabei eine wichtige Rolle, weil eine Rotation um die eigene Achse möglichst exakt bestimmt werden sollte. Für die Versuche eigneten sich vor allem asymmetrische Sphäroide oder Sphäroide, deren Umdrehung aufgrund von Licht- und Schattenreflexionen auf ihrer Oberfläche erkannt werden konnte. Weiterhin war es notwendig, dass sich die Sphäroide in ausreichend Flüssigkeit befanden, damit es ihnen möglich war zu rotieren. Es wurden nur die Versuche ausgewertet, in denen die Sphäroide

2. Materialien und Methoden

ungestört bis zum Ende der Messungen rotierten. Nach jedem Versuch wurde eine Neugebauer-Zählkammer eingelegt, deren Gitterraster fokussiert wurde. Dabei war darauf zu achten, dass die Vergrößerung, welche zuvor für die Messung verwendet worden war, nicht verändert wurde. Durch den Größenvergleich der Sphäroide mit dem Gitterraster auf dem Videoband konnte der Durchmesser des jeweiligen Sphäroids festgelegt werden:

$$d = d \{B\} \times (L / L \{B\})$$

d [mm] = Durchmesser des Sphäroids

$d \{B\}$ [mm] = Durchmesser des Sphäroids am Bildschirm gemessen

L [mm] = Kantenlänge des kleinsten Quadrates des Gitterrasters
(hier: 0,05mm)

$L \{B\}$ [mm] = Kantenlänge des kleinsten Quadrates der Gitterrasters am Bildschirm gemessen

Die Rotationsfrequenz (R) lässt sich aus dem Quotienten der benötigten Umdrehungen (U) durch die gemessene Zeit (t) errechnen:

$$R = U / t$$

Die Rotationsgeschwindigkeit (v) lässt sich aus dem Umfang des jeweiligen Sphäroids durch die benötigte Zeit (t) für eine Umdrehung ermitteln:

$$v = \pi \times d / t$$

wobei (d) dem Durchmesser des Sphäroids entspricht.

Um die Genauigkeit zu optimieren wurden bei dem jeweiligen Sphäroid drei Umdrehungen gestoppt.

2. Materialien und Methoden

2.4 Versuchsprotokoll: Versuche mit Nasalepithel-Sphäroiden gesunder Probanden ohne IL-13 und IL-13 unterschiedlicher Konzentrationen und Stimulation durch γ -ATP

In den folgenden Versuch sollte die Wirkung von IL-13 auf die Geschwindigkeit von rotierenden Nasalepithel-Sphäroiden untersucht werden. Hierbei wurden Sphäroide nach der oben beschriebenen Methode sechs Tage kultiviert. Sie stammten, wie bereits erwähnt, ausschließlich von gesunden Probanden.

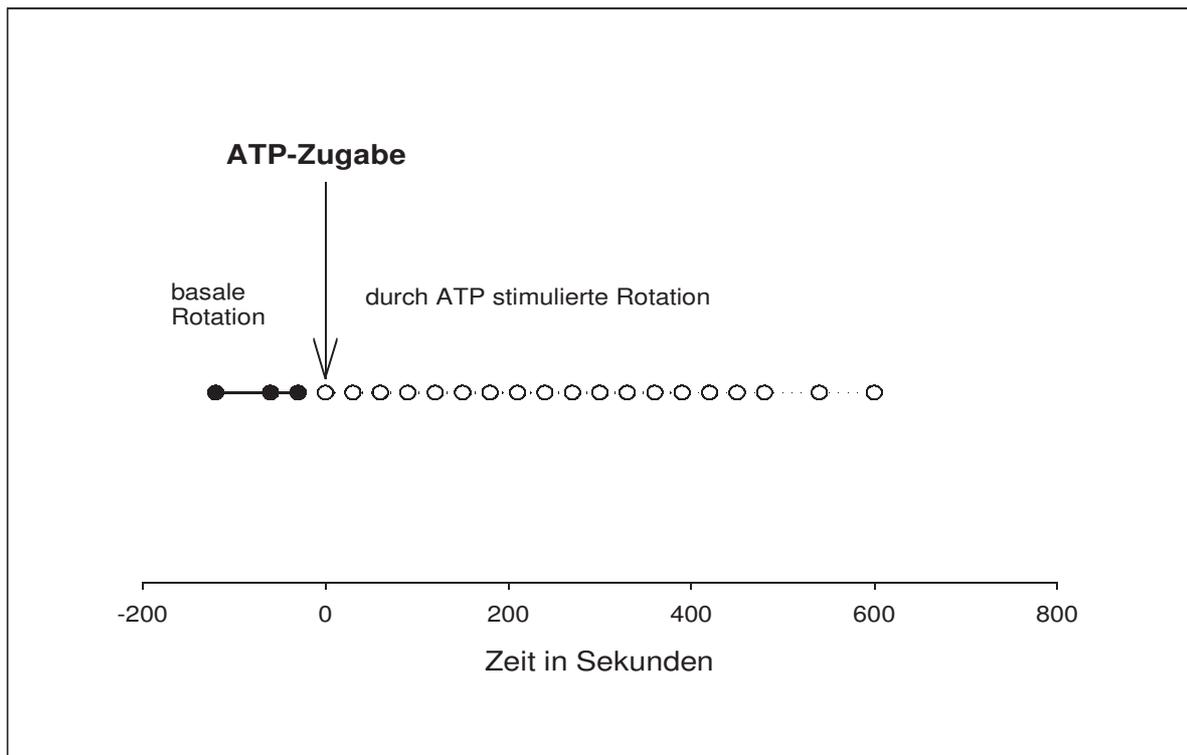
Bei den Versuchen sind drei Gruppen zu unterscheiden. Der ersten Gruppe wurde zum Medium kein Interleukin-13 zugesetzt, sie entspricht der Kontrollgruppe. Den beiden anderen Gruppen wurde IL-13 der Konzentration von 50ng/ml bzw. 100ng/ml während der gesamten Kulturzeit zugeführt.

Für den Versuch in der vorbereiteten Kammer wurde das Kulturmedium der Nasalepithel-Sphäroide erst mit einem sterilem Tupfer abgesaugt, und darauf folgend mit dem Versuchsmedium DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) gewaschen. Dieses Medium enthielt kein IL-13. Anschließend wurde direkt zu der Probe 50 μ l Versuchsmedium vorsichtig pipettiert. Nach einer Adaptionszeit von drei Minuten wurde die Rotation der Nasalepithel-Sphäroide für zwei Minuten auf Video aufgezeichnet. Dies entspricht der basalen Rotationsgeschwindigkeit. Anschließend wurde die Perfusionspumpe gestartet. Dadurch wurde selbstständig vorgewärmtes 500 millimolares γ -ATP mit dem definierten Volumen von 400 μ l befördert. Diese γ -ATP-Lösung konnte aufgrund der permeablen Membran der Inserts zu den Sphäroiden diffundieren und diese stimulieren. Nun wurde die Aufzeichnung für weitere zehn Minuten fortgesetzt. Falls die Sphäroide während der Aufzeichnung zum Stehen kamen, wurde durch weiteres Zufügen von 50 μ l γ -ATP mittels Pipette versucht, die jeweiligen Sphäroide wieder zu einer Rotation zu behelfen.

Die Messung der basalen Geschwindigkeit erfolgte 120 Sekunden, 60 Sekunden und 30 Sekunden vor Zugabe des γ -ATPs. Für die Bestimmung der Rotationsgeschwindigkeit nach Zugabe von γ -ATP wurden Messungen im Abstand von 30 Sekunden für zehn Minuten durchgeführt. Die letzten drei Messungen erfolgten im Abstand von 60 Sekunden. Jede Sphäroidumdrehung wurde visuell beurteilt und mittels eines Excel-Programms gestoppt. Um Ungenauigkeiten zu vermeiden wurde die Zeit für drei Umdrehungen zu den jeweiligen Zeitpunkten bestimmt.

Am Ende jedes Versuches wurde noch das Gitterraster fokussiert und gefilmt, um für die Auswertungen den Durchmesser des jeweiligen Sphäroids bestimmen zu können.

2. Materialien und Methoden



Die Abbildung 2.5 zeigt den zeitlichen Ablauf der mukoziliären Funktionsmessung, wobei jeder Punkt einer ausgewerteten Messung entspricht.

2.5 Statistik

Die statistische Auswertung für den gesamten Verlauf der jeweiligen Gruppen unter Berücksichtigung der Medianwerte erfolgte mittels 'One Way Analysis of Variance'. Für den Vergleich der Maximalwerte in den Gruppen vor und nach Stimulation mit γ -ATP wurde der 'Wilcoxon Signed Rank Test' verwendet. Weiterhin wurden die Versuchsverläufe der jeweiligen Gruppen mit dem 'Linear Mixed Models' Test ausgewertet.

3. Ergebnisse

3. Ergebnisse

3.1 Kultur der Gruppen ohne IL-13, mit 50ng/ml IL-13 und 100 ng/ml IL-13

Um die mukoziliäre Funktion in dieser Arbeit untersuchen zu können, wurden Proben aus dem nasalen respiratorischen Epithel gesunder Probanden entnommen und zu rotierenden Sphäroiden kultiviert. Die Probenentnahme erfolgte mittels Bürstenabstrich aus dem unteren Nasengang.

Unter den 8 Probanden befanden sich zwei Frauen und sechs Männer im Alter von 19-28 Jahren, mittleres Alter $23,9 \pm 3,7$ Jahre (Mittelwert mit Standardabweichung).

Im Folgenden soll die Ausbeute der Nasalepithel-Sphäroide, die für die Versuche geeignet waren, dargestellt werden.

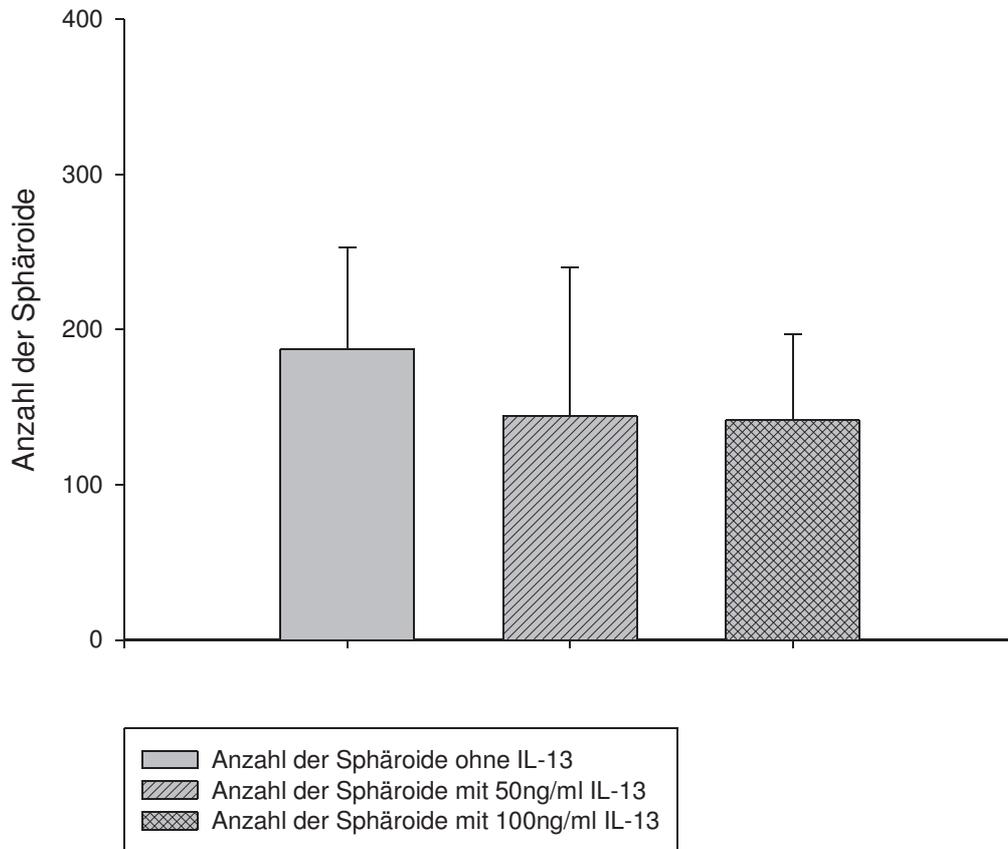
3.1.1 Anzahl der Sphäroide in den verschiedenen Gruppen

Bei allen Probanden lagerten sich aus dem entnommenen Epithel Sphäroide zusammen. Die folgenden Werte stellen die Mittelwerte mit Standardabweichung der Kulturschalen der jeweiligen Gruppen dar (siehe Abbildung 3.1).

In der Kontrollgruppe, zu der kein Interleukin-13 gegeben wurde, bildeten sich 187 ± 66 (Mittelwert mit Standardabweichung) Sphäroide pro Kulturschale. In den Gruppen mit Inkubation von IL-13 zeigten sich folgende Werte: bei Zugabe von 50ng/ml IL-13 entstanden 144 ± 96 (Mittelwert mit Standardabweichung), bei Zugabe von 100ng/ml IL-13 142 ± 55 (Mittelwert mit Standardabweichung) Sphäroide. Der Unterschied hinsichtlich der Anzahl aller gebildeten Sphäroide in den verschiedenen Gruppen ist statistisch nicht signifikant (One Way Analysis of Variance $p=0,222$).

3. Ergebnisse

Anzahl der entstandenen gesamten Sphäroide



Die Abbildung 3.1 zeigt die Anzahl der entstandenen Sphäroide (Mittelwert mit Standardabweichung) in den verschiedenen Gruppen.

3.1.2 Anzahl der rotierenden Sphäroide in den verschiedenen Gruppen

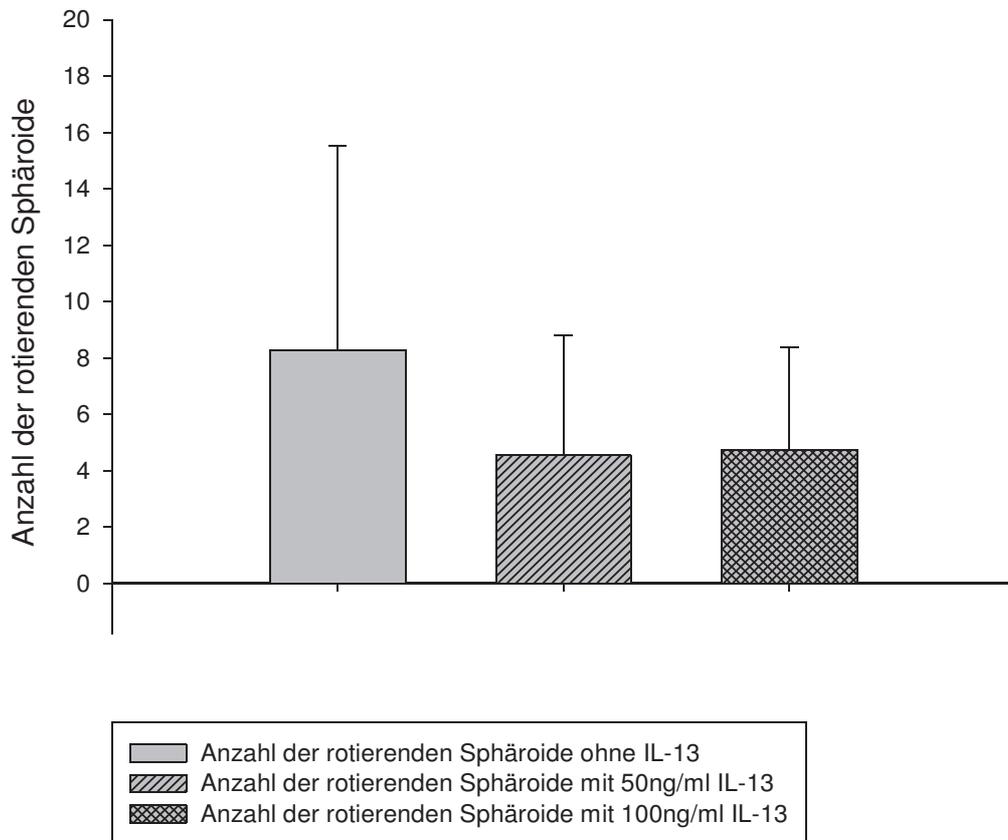
In der Kontrollgruppe entstanden nur bei sieben der acht Probanden bzw. in elf der vierzehn Kulturschalen rotierende Sphäroide. Bei zwei der acht Probanden konnten anstatt zwei Wells für jede Gruppe nur jeweils eine Kulturschale der jeweiligen Gruppe angelegt werden, da die entnommene Epithelprobe nicht ausreichte. Es wurden also insgesamt vierzehn Kulturschalen untersucht. Hier stellen die folgenden Werte die Mittelwerte mit Standardabweichung der Kulturschalen der jeweiligen Gruppen dar (siehe Abbildung 3.2).

Die Anzahl der rotierenden Sphäroide in der Kontrollgruppe betrug $8,3 \pm 7,2$ (Mittelwert mit Standardabweichung). Bei der Gruppe mit Zugabe von 50ng/ml IL-13 zeigten sich in zwei der vierzehn Proben keine Rotationen. Der Mittelwert mit Standardabweichung der gebildeten

3. Ergebnisse

Sphäroide, die rotierten, betrug hier $4,6 \pm 4,2$, in der Gruppe mit 100ng/ml IL-13 betrug er $4,8 \pm 3,6$, wobei hier nur zwölf Proben aufgrund von Verunreinigungen ausgewertet werden konnten, wovon elf rotierende Sphäroide zeigten. Vergleicht man die verschiedene Anzahl an rotierenden Sphäroiden in den drei Gruppen, so lässt sich kein statistisch signifikanter Unterschied feststellen (One Way Analysis of Variance $p=0,410$).

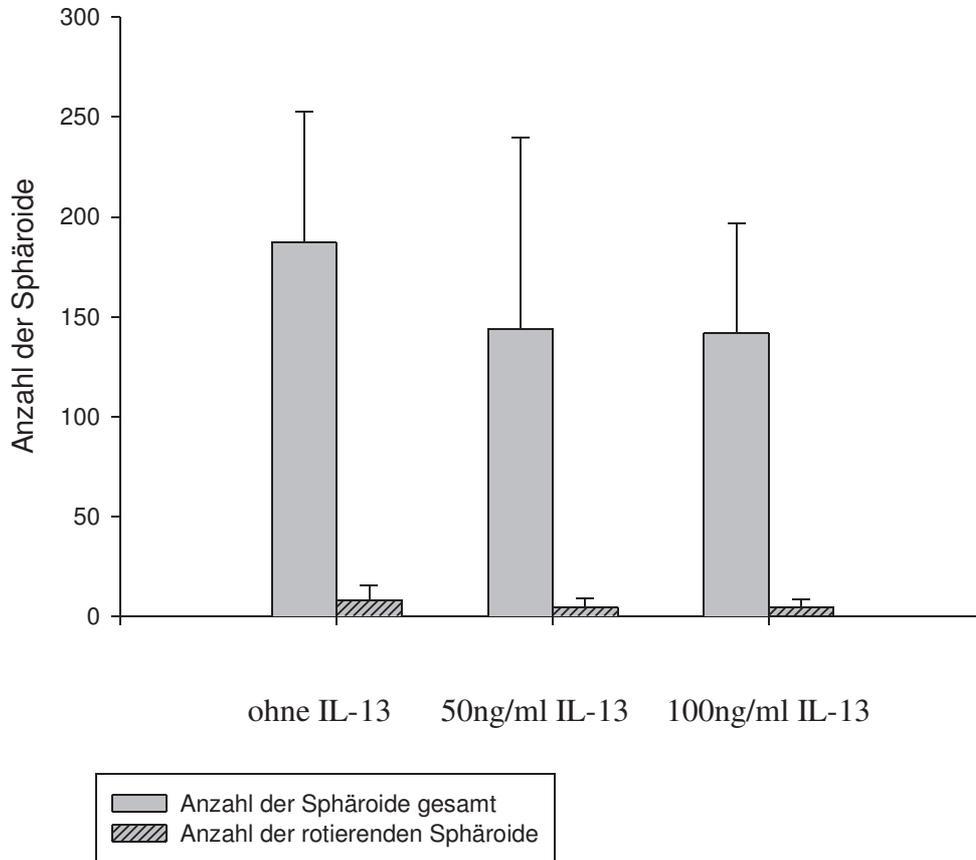
Anzahl der entstandenen rotierenden Sphäroide



Die Abbildung 3.2 zeigt die entstandenen rotierenden Sphäroide (Mittelwert mit Standardabweichung) in den verschiedenen Gruppen.

3. Ergebnisse

Vergleich der entstandenen Sphäroide gesamt und der Anteil der rotierenden Sphäroide



Die Abbildung 3.3 zeigt die entstandenen Sphäroide gesamt (Mittelwert mit Standardabweichung) und der Anteil der rotierenden Sphäroide (Mittelwert mit Standardabweichung) der verschiedenen Gruppen.

3.1.3 Vergleich der Durchmesser der rotierenden Sphäroide in den verschiedenen Gruppen

Der Durchmesser wurde nur von den rotierenden Sphäroiden bestimmt, mit denen die Versuche durchgeführt worden waren (siehe Abbildung 3.4). In die folgende Auswertung gingen also nicht die Werte aller entstandenen Sphäroide mit ein.

Die rotierenden Sphäroide der Kontrollgruppe hatten einen Durchmesser von $0,14\text{mm} \pm 0,06\text{mm}$ (Mittelwert mit Standardabweichung).

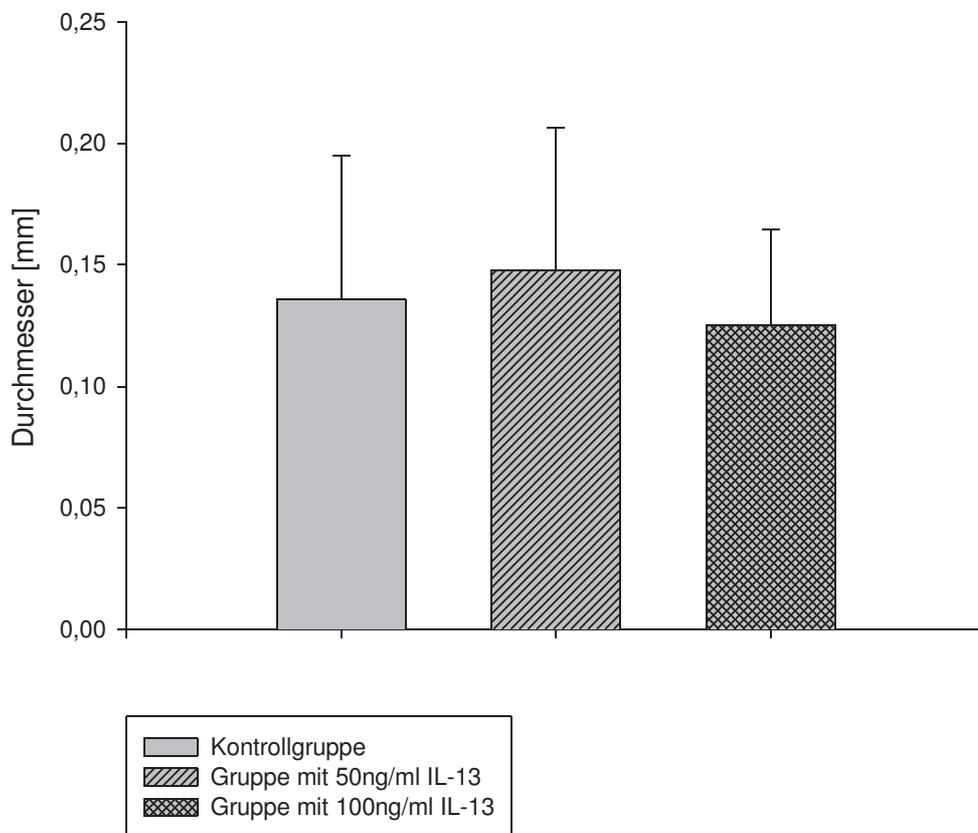
3. Ergebnisse

Bei Inkubation mit 50ng/ml IL-13 wurden die drehenden Sphäroide $0,15\text{mm} \pm 0,06\text{mm}$ (Mittelwert mit Standardabweichung) groß.

Die Rotationssphäroide, die mit 100ng/ml IL-13 kultiviert wurden zeigten einen Durchmesser von $0,13\text{mm} \pm 0,04\text{mm}$ (Mittelwert mit Standardabweichung).

Die unterschiedlichen Durchmesser der Sphäroide in den drei Gruppen sind statistisch nicht signifikant (One Way Analysis of Variance $p=0,407$).

Vergleich der Durchmesser der rotierenden Sphäroide in den verschiedenen Gruppen



Die Abbildung 3.4 zeigt den Vergleich der Durchmesser (Mittelwerte mit Standardabweichung) der rotierenden Sphäroide in den verschiedenen Gruppen.

3. Ergebnisse

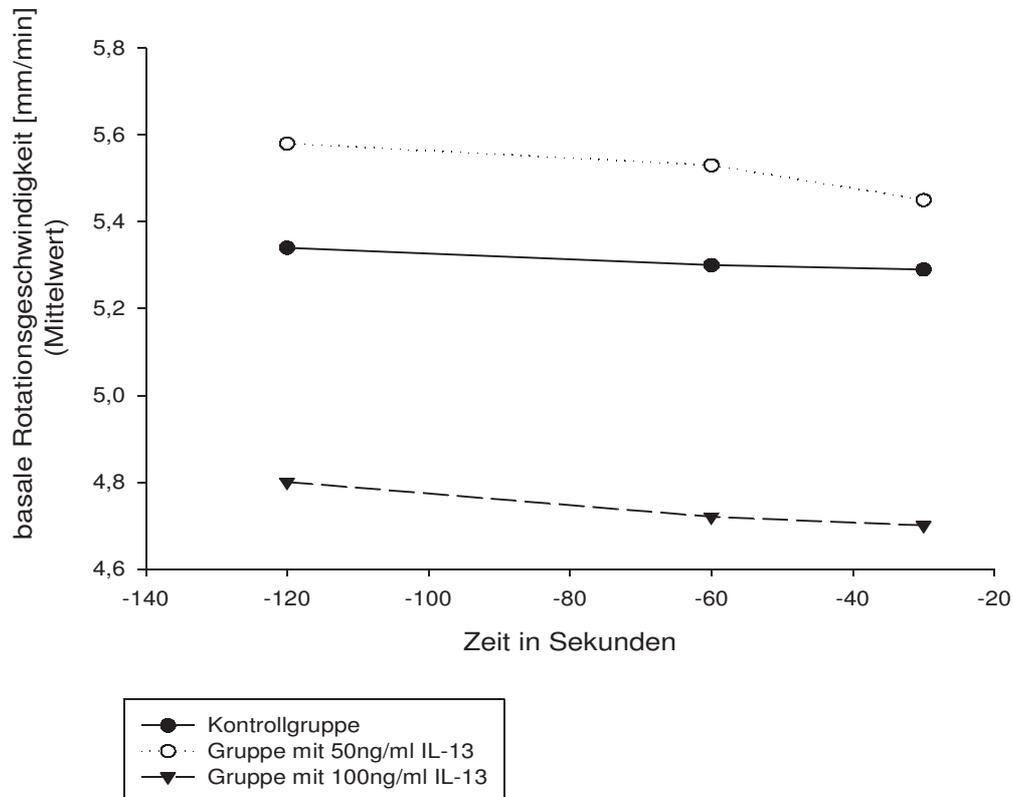
3.2 Vergleich der Rotationsgeschwindigkeiten der Kontrollgruppe mit den Gruppen 50ng/ml und 100 ng/ml IL-13

3.2.1 Basale Geschwindigkeit in den drei Gruppen

3.2.1.1 Variabilität der basalen Geschwindigkeit in den drei Gruppen

Der Verlauf der basalen Geschwindigkeit in den drei Gruppen wurde nun untersucht. Hierzu sind die Medianwerte der maximalen basalen Geschwindigkeiten der jeweiligen Gruppen verglichen worden. Die Unterschiede hinsichtlich der basalen Rotationsgeschwindigkeit in den drei Gruppen sind statistisch nicht signifikant (One Way Analysis of Variance $p=0,479$). Die Verläufe der basalen Geschwindigkeit der verschiedenen Gruppen werden anhand dreier Mittelwerte zu den Zeitpunkten -120 Sekunden, -60 Sekunden und -30 Sekunden in der folgenden Abbildung 3.5 dargestellt.

Verlauf der basalen Rotationsgeschwindigkeit in den verschiedenen Gruppen



Die Abbildung 3.5 zeigt den Verlauf der basalen Rotationsgeschwindigkeit als Mittelwert in den verschiedenen Gruppen.

3. Ergebnisse

3.2.1.2 Vergleich der Rotationsgeschwindigkeiten zwischen den drei Gruppen zum Zeitpunkt -30s bzw. ihrer Maximalwerte

Da nicht alle Sphäroide ihre basale Maximalgeschwindigkeit zum selben Zeitpunkt erreichten, wurden die Rotationsgeschwindigkeiten bei -30 Sekunden und die jeweiligen Maximalwerte vor γ -ATP-Stimulation verglichen. Dadurch sollte gezeigt werden, dass sich die Werte der beiden Zeitpunkte kaum unterscheiden.

In der Kontrollgruppe ist die Geschwindigkeit der rotierenden Sphäroide zum Zeitpunkt -30 Sekunden $5,3 \pm 2$ mm/min (Mittelwert mit Standardabweichung), der maximale Wert der basalen Geschwindigkeit ist hier ebenfalls bei $5,3 \pm 2$ mm/min (Mittelwert mit Standardabweichung).

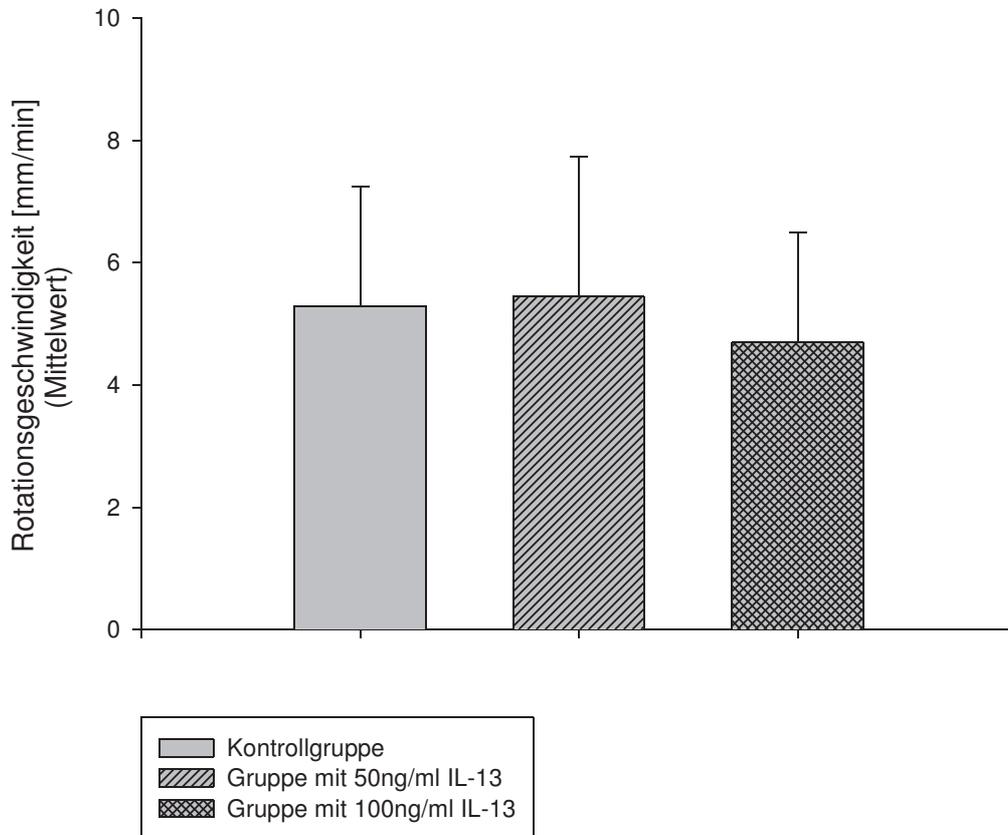
Bei der Gruppe mit Zugabe von 50ng/ml IL-13 ist die Geschwindigkeit zum Zeitpunkt -30 Sekunden $5,5 \pm 2,3$ mm/min (Mittelwert mit Standardabweichung), der Maximalwert liegt bei $5,6 \pm 2,4$ mm/min (Mittelwert mit Standardabweichung).

Die basale Geschwindigkeit der Gruppe mit 100ng/ml IL-13 ist bei -30 Sekunden $4,7 \pm 1,8$ mm/min (Mittelwert mit Standardabweichung), ihr Maximalwert $4,8 \pm 1,8$ mm/min (Mittelwert mit Standardabweichung).

Vergleicht man die Maximalwerte in den drei Gruppen vor ATP-Stimulation, konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt werden (One Way Analysis of Variance $p=0,482$).

3. Ergebnisse

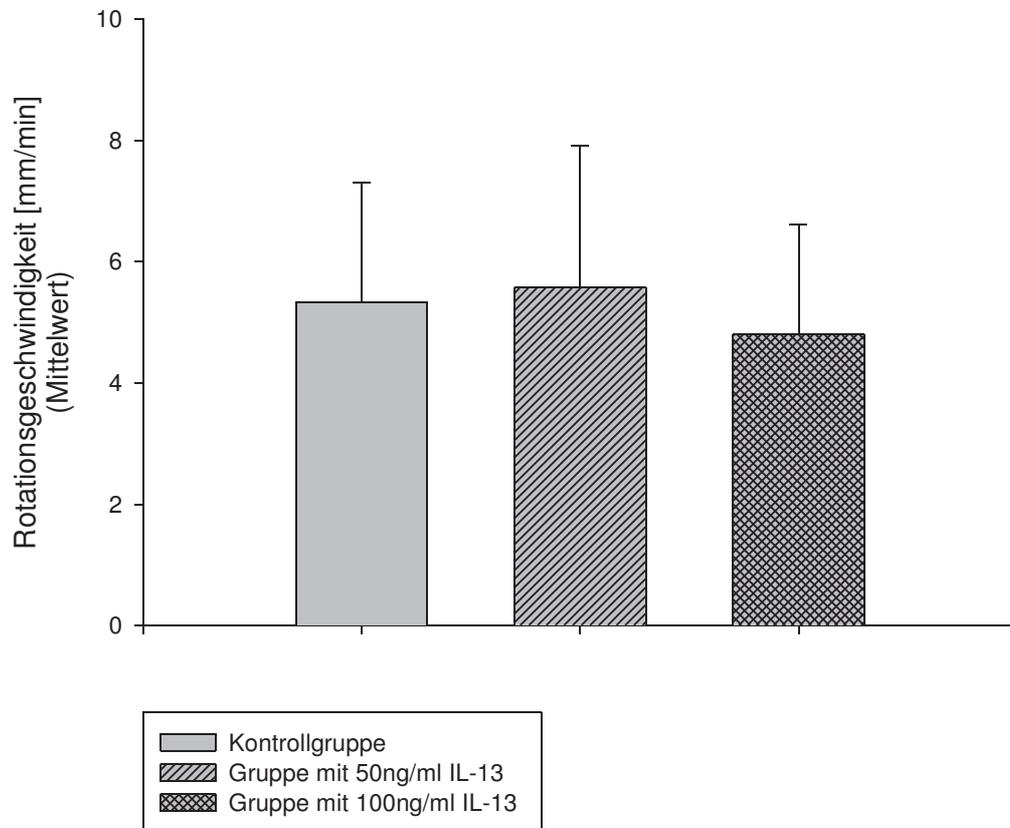
Basale Rotationsgeschwindigkeit zum Zeitpunkt -30 Sekunden



Die Abbildung 3.6 zeigt die basale Rotationsgeschwindigkeit (Mittelwert mit Standardabweichung) der verschiedenen Gruppen zum Zeitpunkt -30 Sekunden.

3. Ergebnisse

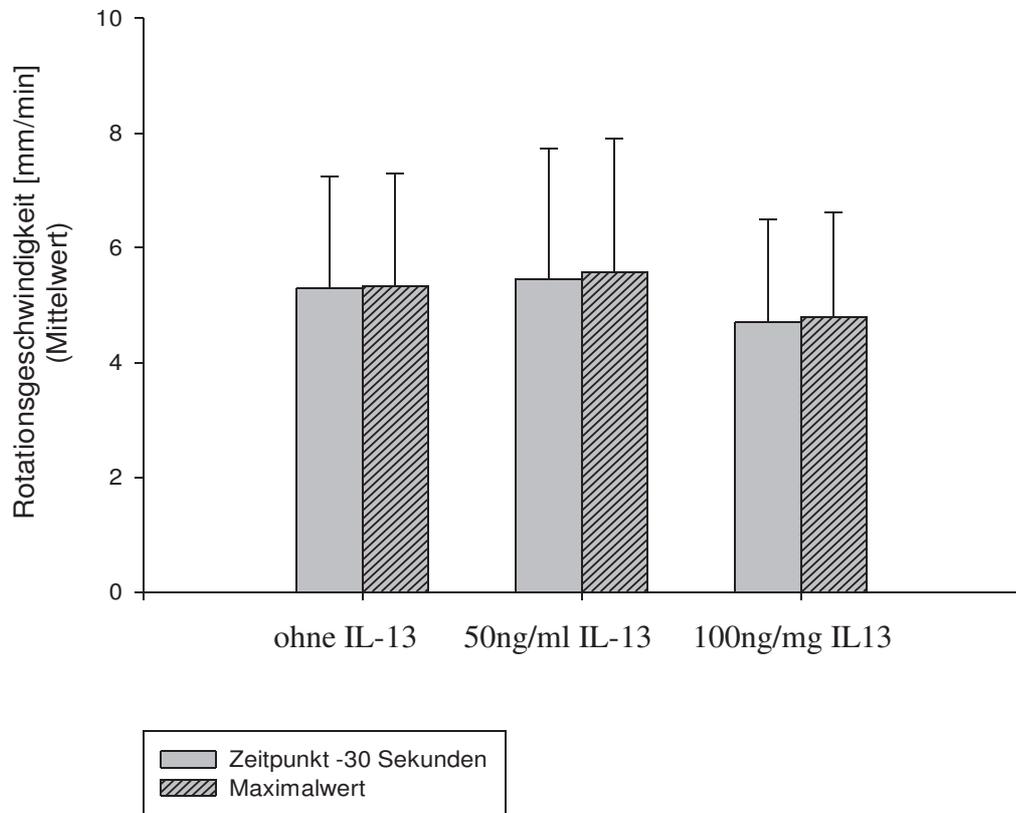
Basale Maximalgeschwindigkeit



Die Abbildung 3.7 zeigt die maximale basale Rotationsgeschwindigkeit (Mittelwert mit Standardabweichung) der verschiedenen Gruppen.

3. Ergebnisse

Vergleich der basalen Rotationsgeschwindigkeit zum Zeitpunkt -30 Sekunden und der basalen Maximalgeschwindigkeit



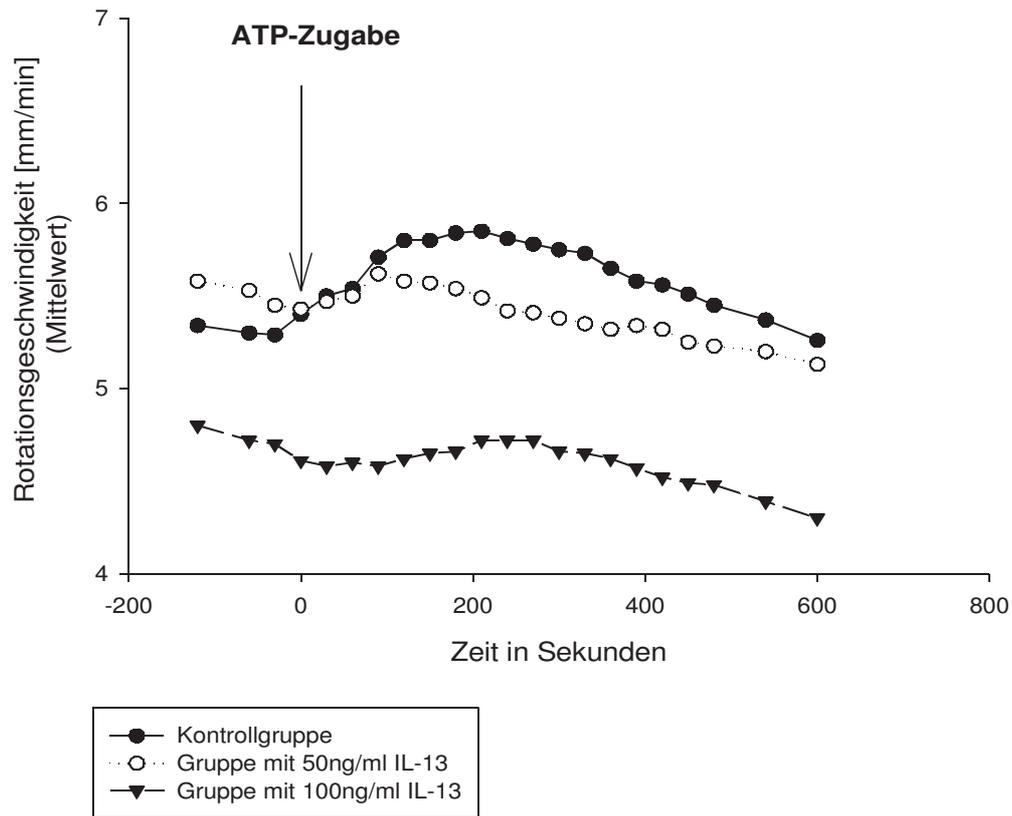
Die Abbildung 3.8 zeigt den Vergleich der basalen Geschwindigkeit zum Zeitpunkt -30 Sekunden (Mittelwert mit Standardabweichung) und der basalen Maximalgeschwindigkeit (Mittelwert mit Standardabweichung) der verschiedenen Gruppen.

3. Ergebnisse

3.2.2 Geschwindigkeit nach γ -ATP-Zugabe in den drei Gruppen

3.2.2.1 Verlauf

Verlauf der Rotationsgeschwindigkeit der verschiedenen Gruppen



Die Abbildung 3.9 zeigt den Verlauf der Rotationsgeschwindigkeit (Mittelwerte) der Gruppen.

Vergleicht man die Verläufe der Rotationsgeschwindigkeiten der verschiedenen Gruppen nach Stimulation mit γ -ATP, wie in der obigen Abbildung 3.9 dargestellt, lässt sich ein Unterschied vermuten, nämlich eine verminderte Stimulierbarkeit der Rotationsgeschwindigkeit in der Gruppe, die mit 100ng/ml IL-13 kultiviert wurde. In der Kontrollgruppe ist die Geschwindigkeit zum Zeitpunkt der γ -ATP-Zugabe $5,4 \pm 2,1$ mm/min (Mittelwert mit Standardabweichung). Sie steigt weiter an und nimmt ihren maximalen Wert nach 210 Sekunden mit $5,9 \pm 2,6$ mm/min (Mittelwert mit Standardabweichung) an. Danach fällt sie und erreicht nach 10 Minuten einen Wert von $5,3 \pm 2,4$ mm/min (Mittelwert mit Standardabweichung).

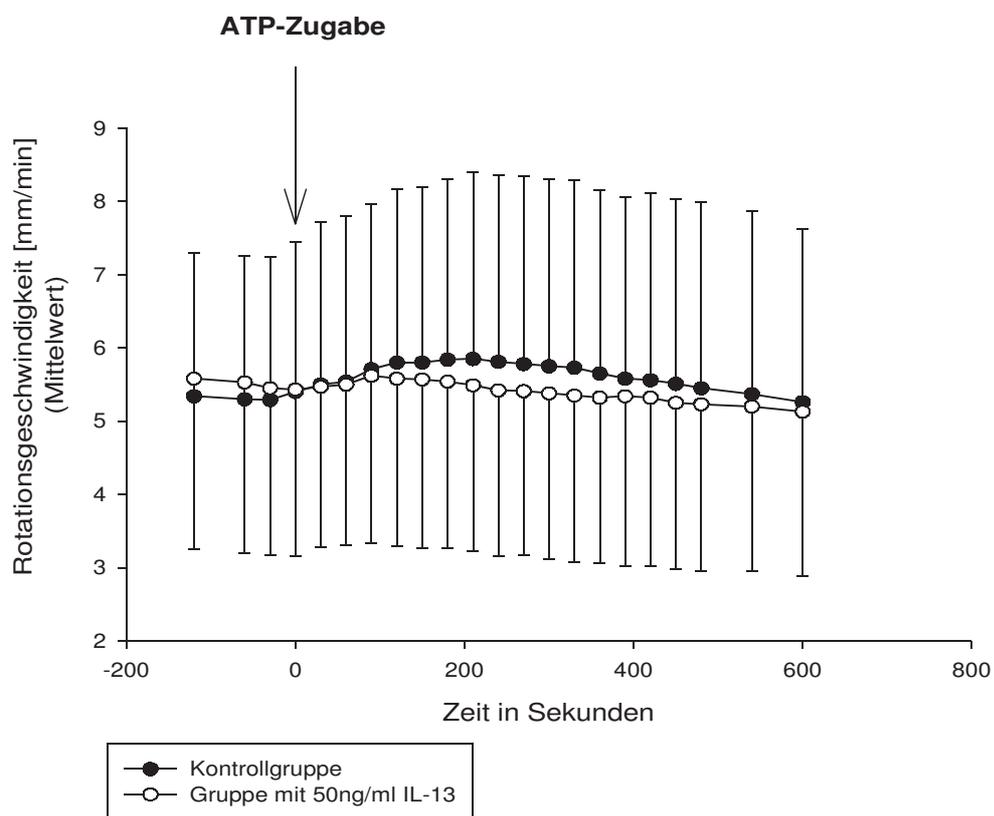
Die Geschwindigkeit in der Gruppe mit 50ng/ml IL-13 beträgt nach Beimengung von

3. Ergebnisse

γ -ATP $5,4 \pm 2,3$ mm/min (Mittelwert mit Standardabweichung) und steigt dann bis auf $5,6 \pm 2,3$ mm/min (Mittelwert mit Standardabweichung) zum Zeitpunkt 90 Sekunden an. Nachdem sie im weiteren Verlauf wieder sinkt, nimmt sie am Ende des Versuches einen Wert von $5,1 \pm 2,3$ mm/min (Mittelwert mit Standardabweichung) an.

Beim Vergleich der Kontrollgruppe und der Gruppe mit Zugabe von 50ng/ml IL-13 zeigten sich jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede anhand des Linear Mixed Models-Testes ($p=0,837$).

Vergleich des Verlaufes der Rotationsgeschwindigkeit zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe mit 50ng/ml IL-13 (mit Standardabweichung)



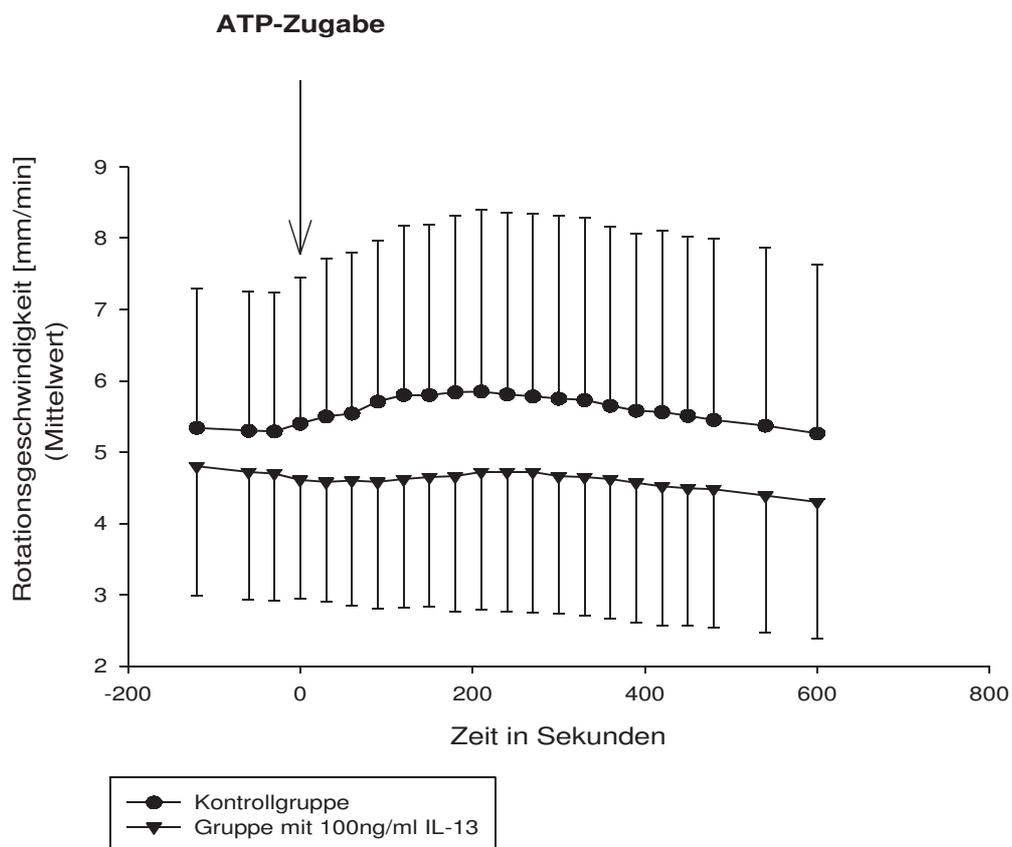
Die Abbildung 3.10 zeigt den Verlauf der Rotationsgeschwindigkeit (Mittelwert mit Standardabweichung) der Kontrollgruppe und der Gruppe mit 50ng/ml IL-13.

3. Ergebnisse

In der Gruppe mit 100ng/ml IL-13 ist die Geschwindigkeit bei γ -ATP-Zugabe mit $4,6 \pm 1,7$ mm/min (Mittelwert mit Standardabweichung). Sie steigt und ist zwischen 210 und 270 Sekunden maximal bei $4,7 \pm 2$ mm/min (Mittelwert mit Standardabweichung), woraufhin sie wieder fällt. Der letzte gemessene Wert ist $4,3 \pm 1,96$ mm/min (Mittelwert mit Standardabweichung).

Beim Vergleich der Kontrollgruppe und der Gruppe mit Zugabe von 100ng/ml IL-13 zeigten sich ebenfalls keine statistisch signifikanten Unterschiede (Linear Mixed Models $p=0,092$). Hier lässt sich jedoch die Tendenz erkennen, dass die Rotationsgeschwindigkeit in der Gruppe mit 100ng/ml IL-13 verlangsamt ist.

Vergleich des Verlaufes der Rotationsgeschwindigkeit zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe mit 100ng/ml IL-13 (mit Standardabweichung)



Die Abbildung 3.11 zeigt den Verlauf der Rotationsgeschwindigkeit (Mittelwert mit Standardabweichung) der Kontrollgruppe und der Gruppe mit 100ng/ml IL-13.

3. Ergebnisse

3.2.2.2 Maximalwerte der drei Gruppen

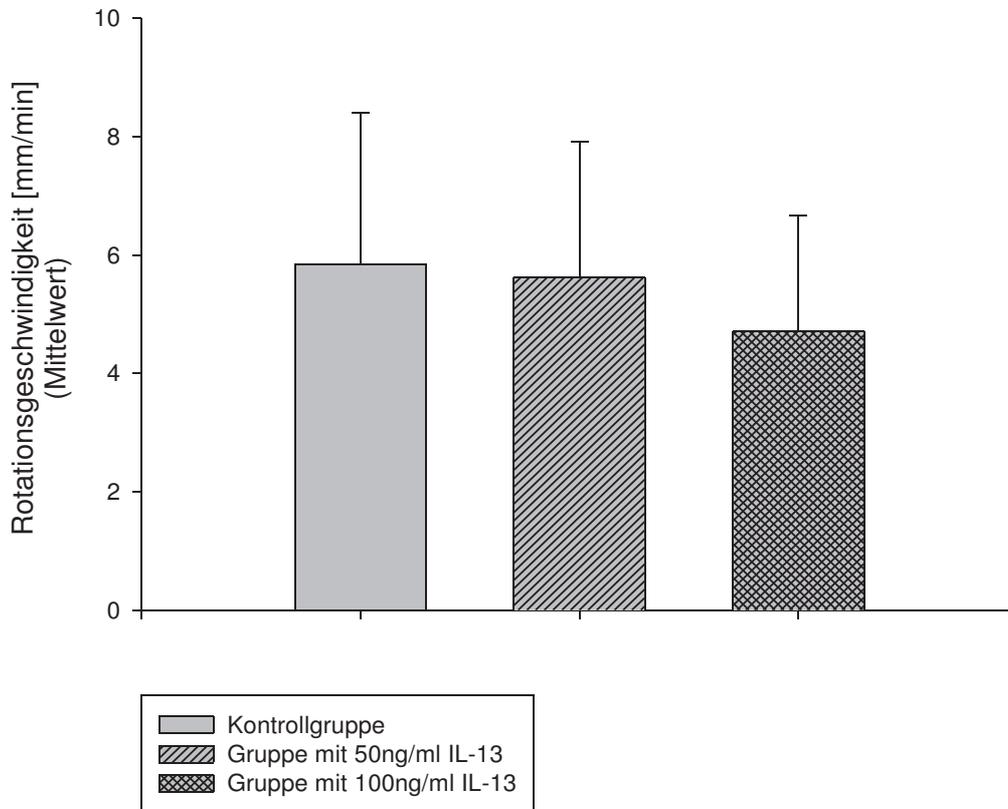
Da die Rotationsgeschwindigkeit bis zum Erreichen des Maximums stark variiert, konnten keine signifikanten Unterschiede beim Vergleich der Gruppen festgestellt werden. Folglich wurde der Maximalwert jedes Sphäroids nach Zugabe von γ -ATP bestimmt.

Vergleicht man die Maximalgeschwindigkeiten der drei Gruppen nach γ -ATP-Zugabe, so zeigt sich bei der Kontrollgruppe ein maximaler Wert von $5,9 \pm 2,6$ mm/min (Mittelwert mit Standardabweichung), in der Gruppe mit 50ng/ml IL-13 beträgt die Maximalgeschwindigkeit $5,6 \pm 2,3$ mm/min (Mittelwert mit Standardabweichung). In der Gruppe mit 100ng/ml IL-13-Zugabe ist der maximale Wert der Geschwindigkeit $4,7 \pm 2$ mm/min (Mittelwert mit Standardabweichung).

Die Maximalwerte der drei Gruppen nach γ -ATP-Stimulation sind untereinander statistisch ebenfalls nicht signifikant unterschiedlich (One Way Analysis of Variance $p=0,244$). Es lässt sich aber ein Trend in Abhängigkeit der IL-13-Konzentration erkennen (Abbildung 3.12).

3. Ergebnisse

Maximalwerte der Rotationsgeschwindigkeit der drei Gruppen nach ATP-Zugabe



Die Abbildung 3.12 zeigt die Maximalwerte der Rotationsgeschwindigkeit (Mittelwert mit Standardabweichung) nach ATP-Zugabe.

3.2.3 Änderung der maximalen Geschwindigkeit in den drei Gruppen nach γ -ATP-Stimulation

Nun wurde die Stimulation der maximalen Geschwindigkeit vor und nach Zugabe von γ -ATP in den drei Gruppen verglichen.

In der Kontrollgruppe liegt der Maximalwert der basalen Geschwindigkeit bei $5,4 \pm 2$ mm/min (Mittelwert mit Standardabweichung), nach γ -ATP-Stimulation bei $5,9 \pm 2,6$ mm/min (Mittelwert mit Standardabweichung). Die Änderung der Maximalwerte vor und nach γ -ATP-Stimulation ist in der Kontrollgruppe statistisch signifikant (Wilcoxon Signed Rank Test $p < 0,001$).

Um einen gleichwertigen Vergleich in den Gruppen mit Interleukin-13 Inkubation zu haben, wurden auch hier die Maximalwerte vor und nach γ -ATP-Stimulation bestimmt. In der

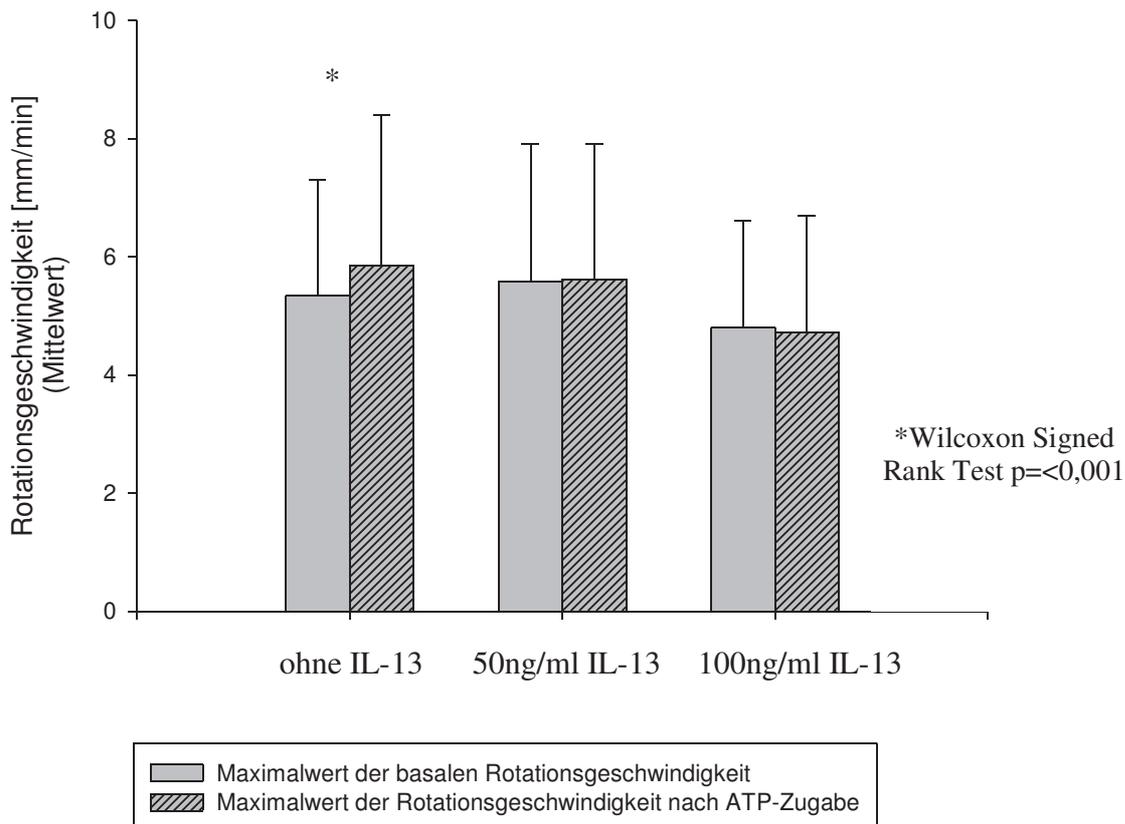
3. Ergebnisse

Gruppe mit 50ng/ml IL-13 erreicht die Maximalgeschwindigkeit vor γ -ATP-Zugabe $5,6 \pm 2,4$ mm/min (Mittelwert mit Standardabweichung), nach Zugabe $5,6 \pm 2,3$ mm/min (Mittelwert mit Standardabweichung).

Die maximale basale Geschwindigkeit in der Gruppe mit 100ng/ml IL-13 liegt bei $4,8 \pm 1,8$ mm/min (Mittelwert mit Standardabweichung), nachdem γ -ATP zugegeben wurde, ist sie hier $4,7 \pm 2$ mm/min (Mittelwert mit Standardabweichung).

Hier zeigt der Paarvergleich der Maximalwerte vor und nach γ -ATP-Zugabe in den beiden Gruppen mit Interleukin-13 keine statistisch signifikante Änderung (Wilcoxon Signed Rank Test $p[50\text{ng/ml IL13}]=0,738$; $p[100\text{ng/ml IL13}]=0,293$).

Vergleich der Maximalwerte der basalen Rotationsgeschwindigkeit mit den Maximalwerten der Rotationsgeschwindigkeit nach ATP-Zugabe in den verschiedenen Gruppen



Die Abbildung 3.13 zeigt den Vergleich der Maximalwerte der basalen Rotationsgeschwindigkeit (Mittelwerte mit Standardabweichung) mit den Maximalwerten der Rotationsgeschwindigkeit nach γ -ATP-Zugabe (Mittelwerte mit Standardabweichung) in den drei Gruppen.

3. Ergebnisse

3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Bei allen Probanden lagerten sich aus dem entnommenen Epithel Sphäroide zusammen. In den verschiedenen Gruppen mit und ohne IL-13 zeigten sich weder in der Anzahl aller gebildeten Sphäroide noch in der Anzahl der rotierenden Sphäroide statistisch signifikante Unterschiede. Auch die Durchmesser der rotierenden Sphäroide in den drei Gruppen waren statistisch nicht signifikant unterschiedlich.

Der Verlauf der basalen Rotationsgeschwindigkeit wie auch der Verlauf der Geschwindigkeit nach γ -ATP-Stimulation waren in allen Gruppen ähnlich und zeigten untereinander keine statistisch signifikanten Unterschiede. Anhand der Kurven kann aber ein Trend zur besseren Stimulierbarkeit der Rotationsgeschwindigkeit in der Kontrollgruppe erkannt werden.

Im Vergleich der Maximalwerte vor und nach γ -ATP-Stimulation kann in der Kontrollgruppe ein signifikanter Anstieg der Rotationsgeschwindigkeit nachgewiesen werden, nicht aber in den IL-13 exponierten Gruppen.

Somit lässt sich eine verminderte Stimulierbarkeit der Rotationsgeschwindigkeit nach Inkubation mit Interleukin-13 nachweisen.

4. Diskussion

4.1 Diskussion der Materialien und Methoden

4.1.1 Diskussion des Sphäroid-Modells

Nasalepithel-Sphäroide entstehen nach Zellentnahme aus dem unteren Nasengang und Kultivierung des respiratorischen Epithels. Sie werden zur Untersuchung der mukoziliären Funktion verwendet. Es stehen aber auch andere Methoden hierfür zur Verfügung.

King beschreibt unterschiedliche Verfahren, in denen respiratorischer Mukus untersucht wird. Neben der zytologischen Bürstentechnik, in der Gewebe aus den pulmonalen Luftwegen mittels einer Bürste gewonnen wird, stellt beispielsweise der magnetische Mikrorheometer eine Untersuchungsmethode dar, bei dem die Viskosität und Elastizität des Mukus ermittelt wird (13). Es kann zum Beispiel auch Bronchialepithel mittels einer bronchoskopischen Biopsie gewonnen werden, oder Operationspräparate verwendet werden (2). Andere Autoren untersuchen immortalisierte Zelllinien des respiratorischen Epithels (18).

Bei der Untersuchung mit Sphäroiden aus dem nasalen respiratorischen Epithel zeigen sich zwei Vorteile. Zum einen ist die Entnahme unkompliziert, da die Probe durch einen einfachen Bürstenabstrich aus der Nase gewonnen wird. Zum anderen können sich dadurch auch gesunde Probanden zur Verfügung stellen, da hier beispielsweise keine Bronchoskopie notwendig ist, die lediglich bei erkrankten Patienten durchgeführt wird. Folglich können hier die Kriterien der Spender besser eingehalten und mehr Probanden untersucht werden.

Weiterhin stellte man fest, dass sich bei der Sphäroidmethode in 94% der Proben Sphäroide und in 83% der Proben rotierende Sphäroide nachzuweisen waren. Wohingegen sich bei bronchialen Proben in nur 72% dieser Proben Sphäroide bildeten (10).

Zur Bestimmung der ziliären Funktion wird auch beispielsweise die Schlagfrequenz der Zilien gemessen (18). Im Gegensatz dazu zeigt die hier verwendete Methode einen großen Vorteil, da der gesamte ziliäre Transport bestimmt wird. Für die ziliäre Funktion spielt nämlich nicht nur die Schlagfrequenz eine Rolle, sondern auch die Koordination und Qualität des Mukus (15). Denn die Transportrate ist umso geringer, je visköser der Mukus ist (13). Folglich wird der ziliäre Transport von vielen Faktoren beeinflusst. Dies bedeutet aber auch, dass diese in unsere Messungen miteingehen. Da wir sie jedoch in den Versuchen nicht unterscheiden können, ist das auch von Nachteil.

4. Diskussion

Das Sphäroidmodell stellt also zusammenfassend eine Methode zur Untersuchung der mukoziliären Funktion dar, die in ihrer einfachen Durchführung und der hohen Ausbeute an Sphäroiden und rotierenden Sphäroiden überzeugt.

4.1.2 Kultur von Nasalepithel-Sphäroiden

Nach Entnahme des Epithels aus dem unteren Nasengang wurde die Probe gewaschen und auf Gewebekulturplatten verteilt. Da die Zellen im eigenen Mukus kultiviert wurden, konnte eine Adhäsion der Epithelzellen an die Kulturschalen verhindert werden, wodurch es ihnen möglich war, sich zu Sphäroiden zusammenzulagern. Ein negativer Effekt auf die mukoziliäre Funktion aufgrund des Mediums ist nicht bekannt. Als Medium wurde Airway Promo Cell Grundlösung verwendet, welches mit dem Serum NCS versetzt wurde. Weiterhin wurden Antibiotika und Antimykotika zur Vermeidung von Verunreinigungen hinzugegeben. Um einen Nährstoffmangel oder ähnliches zu verhindern, wurde das Medium am dritten Tag gewechselt.

4.1.3 Versuchsaufbau und Messung der mukoziliären Funktion

Um die Ergebnisse der Versuche nicht zu verfälschen, wurde stets darauf geachtet, dass der Versuchsaufbau und seine Durchführung so wenig wie möglich von äußeren Störfaktoren beeinflusst werden konnte.

Dazu standen die notwendigen Geräte auf einer festen Arbeitsunterlage.

Weiterhin wurde die Temperatur in der Versuchskammer auf 37°C gehalten, und mit einem Deckgläschen verschlossen. Dadurch sollten Verdunstungen und damit einhergehende Konzentrationsänderungen der Testsubstanzen verhindert werden.

Um die Videoaufzeichnung auch während der Zugabe von γ -ATP nicht zu unterbrechen, wurden das Mikroskop und die Videokamera entsprechend angebracht. Es kam jedoch vor, dass durch Flüssigkeitszugabe die entsprechenden Sphäroide teilweise forttransportiert wurden, sodass sie nach Beimengung von γ -ATP wieder neu fokussiert werden mussten.

Um die Rotationsgeschwindigkeit bestimmen zu können, wurde die Zeit gestoppt, welche das jeweilige Sphäroid für drei Umdrehungen benötigte. Durch Rückspulen des Videos und anhand einer im Video mitlaufenden Uhr konnte die benötigte Zeit auf 0,01 Sekunden genau ermittelt werden. Eine Umdrehung wurde aufgrund der asymmetrischen Form der Sphäroide

4. Diskussion

erkannt und gemessen. Um die Messung so genau wie möglich durchzuführen und etwaig auftretende Schwankungen zu minimieren, wurde für die Auswertung der Mittelwert von drei Umdrehungen bestimmt.

Der Vorteil dieser Methode zur Bestimmung der mukoziliären Funktion liegt klar in der Einfachheit des Aufbaus und der Durchführung des Versuches. Hiermit können Aussagen über die Effektivität des Zilienschlages und damit der Schlagfrequenz getroffen werden. Erhöht sich nämlich die Rotationsgeschwindigkeit des Sphäroids, ist das mit einer Erhöhung der ziliären Schlagfrequenz gleichzusetzen.

Man muss aber beachten, dass die Zilien von ihrer eigenen periziliären Flüssigkeit umgeben sind, und die Sphäroide selbst im eigenen Mukus rotieren. Das bedeutet, dass jegliche Veränderungen dieser beiden Komponenten sich auch auf die Rotationsgeschwindigkeit auswirken können. Jedoch lässt sich bei dieser Versuchsmethode nichts über die Zusammensetzung des Mukus und seine Interaktion mit den Zilien aussagen, was aber die mukoziliäre Funktion beeinflusst (13,15). Mit großer Wahrscheinlichkeit hatten auch Waschen und Mediumwechsel während der Kulturzeit einen Einfluss auf die muköse Zusammensetzung.

Nichtsdestotrotz stellt das hier verwendete Verfahren im Aufbau und in der Durchführung eine einfache Methode dar, die mukoziliäre Funktion in ihrer Gesamtheit, aber auch den Einfluss verschiedener Testsubstanzen auf die mukoziliäre Funktion zu untersuchen. Durch die einfache Entnahme aus der Nase können sowohl erkrankte Patienten als auch gesunde Menschen als Probanden hinzugezogen werden.

4.1.4 Diskussion der Wirkungen von γ -ATP und IL-13

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob sich die Rotationsgeschwindigkeit von Nasalepithel-Sphäroiden gesunder Probanden durch Zugabe von γ -ATP steigern lässt, und ob IL-13 der Konzentration 50ng/ml bzw. 100ng/ml in diesem Zusammenhang einen Einfluss auf die Kultur und die Rotation der Sphäroide hat.

4.1.4.1 γ -ATP

Das für die Versuche verwendete γ -ATP wurde nach 120 Sekunden mittels Perfusionspumpe zu den Insert transportiert, wodurch es zu einer mechanischen Irritation kommen konnte.

4. Diskussion

Selten kam ein Sphäroid zum Stehen. Dann wurde nochmals γ -ATP in die Versuchsschale pipettiert. Beides hatte manchmal zur Folge, dass die mikroskopisch fokussierten Sphäroide forttransportiert wurden. Die darauf folgende neue Einstellung im Mikroskop hatte für die Auswertung eine zeitliche Unterbrechung als Konsequenz. Weiterhin wird berichtet, dass respiratorisches Epithel auf Stress wie Pipettieren mit einer Ausschüttung von γ -ATP reagiert (6,26). Deshalb wurde, falls notwendig, einerseits eine geringe Menge γ -ATP, sprich 50 μ l, zugegeben, und andererseits stets auf die vorsichtige und langsame Beimengung des jeweiligen Mediums geachtet. In einer anderen Arbeitsgruppe wurde diese Irritation weiter untersucht: die Zugabe von DMEM, nachdem ATP bereits zugefügt wurde, führte bei gesunden Probanden mit oder ohne IL-13 in der Kultur zu keiner signifikanten Änderung der Rotationsgeschwindigkeit (29).

4.1.4.2 Interleukin-13

Interleukin-13 ist ein Zytokin der TH2-Immunantwort und wirkt auf unterschiedliche Weise auf das respiratorische Epithel. Neben der Erhöhung der Anzahl der Becherzellen nimmt es durch Stimulation auch Einfluss auf die Mukusproduktion (14,18).

In den Versuchen wurde Interleukin-13 unterschiedlicher Konzentration, nämlich 50ng/ml und 100ng/ml, verwendet. Allerdings ist zu beachten, dass nicht jedes Well die gleiche Menge an nasalem Epithel enthielt, und so bei Zugabe gleicher IL-13-Konzentrationen die Endkonzentrationen der jeweiligen Kulturschalen leicht variieren können.

Laoukili beschreibt weiterhin die Hemmung der Ziliogenese durch IL-13 (18). In dem Sphäroidmodell wird jedoch bereits ausdifferenziertes Epithel untersucht, weshalb IL-13 vermutlich die Ziliogenese selbst nicht mehr entscheidend beeinträchtigen kann, aber trotzdem noch zu einem Verlust der Zilien führen könnte.

Da in den entnommenen respiratorischen Proben auch andere Zellen, wie Mastzellen, T-Lymphozyten und Granulozyten, enthalten sind, könnte Interleukin-13 auch indirekt einen Einfluss auf die Versuche haben.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.1.2 Kultur von Nasalepithel-Sphäroiden gesunder Probanden

Am sechsten Tag nach Kultivierung hatten sich bei sieben der acht Probanden aus den durch Bürstenabstrich entnommenen Zellen Sphäroide gebildet. Die Proben von nasalem Epithel wurden von gesunden Probanden entnommen.

In der Kontrollgruppe ohne IL-13 Beimengung bildeten sich 187 ± 66 (Mittelwert mit Standardabweichung) Sphäroide, wobei hier 8 ± 7 (Mittelwert mit Standardabweichung) rotierten. Bei Zugabe von 50ng/ml IL-13 entstanden 144 ± 96 (Mittelwert mit Standardabweichung) Sphäroide bzw. $4,6 \pm 4,2$ (Mittelwert mit Standardabweichung) rotierende Sphäroide; bei Zugabe von 100ng/ml IL-13 142 ± 55 (Mittelwert mit Standardabweichung) Sphäroide, wovon $4,8 \pm 3,6$ rotierten. Von den insgesamt 40 Wells standen 6 für die Versuche nicht zur Verfügung, da sich hier keine rotierenden Epithel-Sphäroide bildeten. Insgesamt erwies sich die Rotation als stabil, nur wenige kamen während der Versuchsdurchführung zum Stehen, und konnten deshalb nicht ausgewertet werden. Es konnten also ausreichend Sphäroide aus respiratorischem Epithel kultiviert, und deren mukoziliäre Funktion untersucht werden. Die verschiedenen Durchmesser in den drei Gruppen sind statistisch nicht signifikant. Da Interleukin-13 die Ziliogenese hemmt (18), zogen wir in Betracht, dass weniger rotierende Sphäroide in den Gruppen mit IL-13 Inkubation gebildet werden könnten. Es konnten jedoch weder in der Anzahl der rotierenden Sphäroide, noch in der gesamten Anzahl der Sphäroide in den drei Gruppen Unterschiede festgestellt werden. Dies ist womöglich darauf zurückzuführen, dass trotz Zugabe von IL-13 genügend Zilien gebildet wurden, um den Sphäroiden eine Rotation zu ermöglichen, oder IL-13 die Ziliogenese nicht ausreichend beeinflussen konnte, da schon ausdifferenziertes Epithel untersucht wurde.

4.2.2 Diskussion der Ergebnisse der drei Versuchsgruppen

In den Versuchen sollte zum einen gezeigt werden, ob Interleukin-13 einen Einfluss auf die mukoziliäre Funktion von Nasalepithel-Sphäroiden hat. Zum anderen sollte untersucht werden, ob γ -ATP die Rotationsgeschwindigkeit der kultivierten Nasalepithel-Sphäroiden steigert und in wie weit hier IL-13 eine Rolle spielt.

4. Diskussion

Hierzu wurde nach sechstägiger Kultivierung des respiratorischen Epithels bei der Durchführung der Versuche 400µl γ -ATP der Konzentration 500 mMol/l zugeführt und die Rotationsgeschwindigkeit gemessen. Es wurden drei Gruppen unterschieden, nämlich die Kontrollgruppe ohne Inkubation von IL-13, eine Gruppe mit 50ng/ml IL-13, und eine Gruppe mit Zusatz von 100ng/ml IL-13.

Vor der Stimulation mit γ -ATP wurde die basale Rotationsgeschwindigkeit für zwei Minuten bestimmt. Zwischen den drei Gruppen zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied. Die erwartete verlangsamte Geschwindigkeit in den Gruppen mit Zusatz von IL-13 blieb aus. Laoukili beschrieb, dass respiratorische Epithelzellen durch IL-13 beeinflusst werden, indem zum einen weniger ziliotragende Zellen entstehen, und zum anderen die Zilien langsamer schlagen (18). Er kultivierte die Sphäroide jedoch aus gelösten Monolayer-Kulturen, bei denen es erst zur Ziliogenese kommen musste. In dieser Arbeit konnte IL-13 vermutlich nicht die Ziliogenese beeinflussen, da schon ausdifferenzierte Sphäroide als Proben entnommen wurden. Die Annahme, dass die Konzentrationen von Interleukin-13 eventuell nicht ausreichend hoch waren, wird dadurch widerlegt, dass auch Laoukili bei seinen Messungen IL-13 Konzentrationen zwischen 1 und 100 ng/ml verwendet hat (18).

Vergleicht man die Rotationsgeschwindigkeiten vor und nach γ -ATP-Stimulierung in den drei Gruppen, so lässt sich kein statistisch signifikanter Unterschied feststellen. Jedoch lässt sich die Tendenz zu einer verlangsamten Rotationsgeschwindigkeit in der Gruppe mit 100ng/ml IL-13 vermuten (Linear Mixed Models Test). Eine Verlangsamung in den Gruppen mit IL-13 Zugabe wurde erwartet, da IL-13 die ziliäre Schlagfrequenz erniedrigt (11,18).

Vergleicht man die Maximalgeschwindigkeiten in den Gruppen vor und nach Zugabe von γ -ATP, so konnte in der Kontrollgruppe die maximale Geschwindigkeit durch γ -ATP gesteigert werden. Dies haben wir auch erwartet, da sich durch γ -ATP die mukoziliäre Funktion steigern lässt (6,21). In den Gruppen mit Interleukin-13 Inkubation konnte dies nicht beobachtet werden. Die Maximalgeschwindigkeit in der Gruppe mit Zugabe von 50ng/ml IL-13 bleibt nach γ -ATP Stimulierung annähernd gleich, wohingegen in der Gruppe mit Zugabe von 100ng/ml IL-13 eine leichte Abnahme der maximalen Geschwindigkeit zu erkennen ist. Dies lässt vermuten, dass Interleukin-13 die Stimulierbarkeit der Rotationsgeschwindigkeit mit γ -ATP herabsetzt. Das ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass IL-13 zu einem Verlust des Flimmerepithels führt (11,18), was in zukünftigen Experimenten genauer ermittelt werden kann. Da allerdings die hier verwendeten Konzentrationen von IL-13 keine statistisch signifikante Änderungen zeigten, sollten in weiteren Messungen die Auswirkung höherer Konzentrationen von IL-13 untersucht werden.

5. Zusammenfassung

5.1 Ziele

Ziel dieser Arbeit war es, anhand von Nasalepithel-Sphäroiden den Einfluss von Interleukin-13 auf die mukoziliäre Funktion und deren Stimulierbarkeit durch γ -ATP bei gesunden Probanden zu untersuchen.

Nasalepithel-Sphäroide sind kugelförmige Konglomerate, die sich nach Kultivierung aus Zellen des nasalen respiratorischen Epithels zusammenlagern. Das Epithel für die Versuche wurde mittels Bürstenabstrich aus dem unteren Nasengang gewonnen und für sechs Tage im flüssigen Medium kultiviert. Da die respiratorischen Epithelzellen Zilien tragen, war es möglich, dass die Sphäroide durch den simultanen Zilienschlag in ihrem eigenen Mukus rotierten. Diese Rotationsgeschwindigkeit wurde bei den Versuchen gemessen und als Parameter für die mukoziliäre Funktion verwendet.

In den durchgeführten Messungen sollte untersucht werden, ob Interleukin-13 unterschiedlicher Konzentration die Kultur von Nasalepithel-Sphäroiden bzw. ihre Rotation beeinflusst.

In den Versuchen wurde nasales respiratorisches Epithel von gesunden Probanden entnommen und in ‚transwell‘-Einsätze verteilt. Bei der Kultivierung konnte man drei Gruppen unterscheiden: die erste Gruppe wurde als Kontrollgruppe mit Medium ohne Zusatz von IL-13 versetzt; die anderen beiden Gruppen wurden mit IL-13 der Konzentration 50ng/ml bzw. 100ng/ml kultiviert. Dabei sollte der Einfluss von IL-13 auf die mukoziliäre Funktion untersucht werden. Weiterhin wurde untersucht, ob sich die ziliäre Funktion durch Zugabe von γ -ATP, welches während der Versuche in die Versuchskammer mittels Perfusionspumpe zugefügt wurde, stimulieren lässt bzw. ob IL-13 diese Stimulation beeinflusst.

5. Zusammenfassung

5.2 Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Folgende Aspekte wurden bei der Kultur der Nasalepithel-Sphäroide berücksichtigt: Zahl der entstandenen Sphäroide, Anteil der rotierenden Sphäroide, sowie Durchmesser der rotierenden Sphäroide. Hier zeigten sich keine Unterschiede in den verschiedenen Gruppen.
2. Die basale Rotationsgeschwindigkeit war bei den Sphäroiden mit und ohne IL-13 Inkubation gleich. Da Interleukin-13 zu einem Verlust des Flimmerepithels führt und die ziliäre Schlagfrequenz erniedrigt (11,18), wäre ein negativer Effekt auf die basale Geschwindigkeit der Nasalepithel-Sphäroide zu erwarten gewesen. Dieser ließ sich hier allerdings nicht feststellen.
3. Die Rotationsgeschwindigkeit der Nasalepithel-Sphäroide ließ sich in der Kontrollgruppe ohne Inkubation mit IL-13 durch γ -ATP signifikant erhöhen. In den Gruppen mit IL-13 kam es nach Zugabe von γ -ATP zu keiner signifikanten Änderung der Rotationsgeschwindigkeit. Dies lässt darauf schließen, dass die γ -ATP-Stimulierbarkeit durch IL-13 herabgesetzt wird.

5.3 Schlussfolgerung

Diese Arbeit zeigt, dass das Sphäroid-Modell geeignet ist, die mukoziliäre Funktion zu untersuchen.

Interleukin-13 nimmt keinen Einfluss auf die Kultur von Nasalepithel-Sphäroiden bezüglich der Anzahl aller Sphäroide, und der Anzahl bzw. Durchmesser der rotierenden Sphäroide. Die Zugabe von Interleukin-13 der Konzentration 50ng/ml und 100ng/ml wirkt sich nicht auf die basale Rotationsgeschwindigkeit der kultivierten Sphäroide aus.

Die Rotationsgeschwindigkeit der Nasalepithel-Sphäroide ohne Inkubation von IL-13 lässt sich durch γ -ATP erhöhen. Es zeigt sich keine Änderung der Rotationsgeschwindigkeit bei den Gruppen mit IL-13 nach γ -ATP-Stimulierung. IL-13 hat also möglicherweise einen negativen Effekt auf die Stimulierbarkeit der Rotationsgeschwindigkeit nach γ -ATP-Zugabe.

5.4 Zukünftige Fragestellungen

- Vielleicht könnte im Vergleich zu einer Gruppe ohne IL-13-Zusatz eine signifikant verlangsamte Rotationsgeschwindigkeit vor bzw. nach ATP-Stimulation bei Zugabe höherer IL-13-Konzentrationen erreicht werden.
- Interessant wäre auch der Vergleich der Ergebnisse mit Stimulation der Rotationsgeschwindigkeit mit reinem ATP.

6. Abkürzungen

6. Abkürzungen

ATP:	Adenosin 5`Triphosphat
B-Zellen:	B-Lymphozyten
DAG:	Diacylglycerin
DMEM:	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
IgE:	Immunglobulin E
IL-13:	Interleukin-13
IP3:	Inositoltriphosphat
MHC:	Major Histocompatibility Complex
NCS:	Newborn Calf Serum
NO:	Stickstoffmonoxid
P2:	Purinorezeptor Typ 2
TH:	Thymozyten-Helferzellen
R:	Rotationsfrequenz
t:	Zeit
U:	Umdrehung

7.Literaturverzeichnis

1. Akaiwa M, Yu B, Umeshita-Suyama R, Terada N, Suto H, Koga T, Arima K, Matsushita S, Saito H, Ogawa H, Furue M, Hamasaki N, Ohshima K, Izuhara K. ***Localization of human interleukin 13 receptor in non-haematopoietic cells.*** Cytokine 2001 Jan 21; 13(2):75-84.
2. Bals R, Gamarra F, Kaps A, Grundler S, Huber RM, Welsch U. ***Secretory cell types and cell proliferation of human bronchial epithelial cells in an organ-culture system.*** Cell Tissue Res. 1998 Sep;293(3):573-7.
3. Brombacher F. ***The role of interleukin-13 in infectious diseases and allergy.*** Bioessays. 2000 Jul;22(7):646-56.Review.
4. Diaz-Sanchez D, Tsien A, Fleming J, Saxon A. ***Combined diesel exhaust particulate and ragweed allergen challenge markedly enhances human in vivo nasal ragweed-specific IgE and skews cytokine production to a T helper cell 2-type pattern.*** J Immunol. 1997 Mar 1;158(5):2406-13.
5. Donaldson DD, Whitters MJ, Fitz LJ, Neben TY, Finnerty H, Henderson SL, O'Hara RM JR, Beier DR, Turner KJ, Wood CR, Collins M. ***The murine IL-13 receptor alpha 2: molecular cloning, characterization, and comparison with murine IL-13 receptor alpha 1.*** J Immunol. 1998 Sep 1;161(5):2317-24.
6. Donaldson SH, Lazarowski ER, Picher M, Knowles MR, Stutts MJ, Boucher RC. ***Basal nucleotide levels, release, and metabolism in normal and cystic fibrosis airways.*** Mol Med. 2000 Nov;6(11):969-82.
7. Evans JH, Sanderson MJ. ***Intracellular calcium oscillations regulate ciliary beat frequency of airway epithelial cells.*** Cell Calcium. 1999 Sep-Oct;26(3-4):103-10.
8. Evans JH, Sanderson MJ. ***Intracellular calcium oscillations induced by ATP in airway epithelial cells.*** Am J Physiol. 1999 Jul;277(1 Pt 1):L30-41.
9. Finkelman FD, Urban JF Jr. ***The other side of the coin: the protective role of the TH2 cytokines.*** J Allergy Clin Immunol. 2001 May; 107(5):772-80. Review.
10. Gamarra F, Bergner A, Strauss E, Stocker I, Stefan G, Huber RM. ***Rotation Frequency of human bronchial and nasal epithelial spheroids as an indicator of mucociliary function.*** Published online:April 7,2006
11. Gomperts BN, Kim LJ, Flaherty SA, Hackett BP. ***IL-13 regulates cilia loss and foxj1 expression in human airway epithelium.*** Am J Respir Cell Mol Biol. 2007 Sep;37(3):339-46. Epub 2007 May 31.
12. Ho JC, Chan KN, Hu WH, Lam WK, Zeng L, Tipoe GL, Sun J, Leung R, Tsang KW. ***The effect of aging on nasal mucociliary clearance, beat frequency, and ultrastructure of respiratory cilia.*** Am J Respir Crit Care Med. 2001 Mar;163(4):983-8.

7.Literaturverzeichnis

13. King M. *Experimental models for studying mucociliary clearance*. Eur Respir J. 1998 Jan;11(1):222-8. Review.
14. Kikuchi T, Shively JD, Foley JS, Drazen JM, Tschumperlin DJ. *Differentiation-dependent responsiveness of bronchial epithelial cells to IL-4/13 stimulation*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2004 Jul;287(1):L119-26. Epub 2004 Mar 12.
15. Knowles MR, Boucher RC. *Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways*. J Clin Invest. 2002 Mar;109(5):571-7.
16. Kondo M, Tamaoki J, Takeyama K, Nakata J, Nagai A. *Interleukin-13 induces goblet cell differentiation in primary cell culture from Guinea pig tracheal epithelium*. Am J Respir Cell Mol Biol. 2002 Nov;27(5):536-41.
17. Korngreen A, Ma W, Priel Z, Silberberg SD. *Extracellular ATP directly gates a cation-selective channel in rabbit airway ciliated epithelial cells*. J Physiol. 1998 May 1;508(Pt 3):703-20.
18. Laoukili J, Perret E, Willems T, Minty A, Parthoens E, Houcine O, Coste A, Jorissen M, Marano F, Caput D, Tournier F. *IL-13 alters mucociliary differentiation and ciliary beating of human respiratory epithelial cells*. J Clin Invest. 2001 Dec;108(12):1817-24.
19. Lazarowski ER, Boucher RC, Harden TK. *Constitutive release of ATP and evidence for major contribution of ecto-nucleotide pyrophosphatase and nucleoside diphosphokinase to extracellular nucleotide concentrations*. J Biol Chem. 2000 Oct 6;275(40):31061-8.
20. Matsui H, Randell SH, Peretti SW, Davis CW, Boucher RC. *Coordinated clearance of periciliary liquid and mucus from airway surfaces*. J Clin Invest. 1998 sep 15;102(6):1125-31.
21. Morse DM, Smullen JL, Davis CW. *Differential effects of UTP, ATP, and adenosine on ciliary activity of human nasal epithelial cells*. Am J Physiol cell Physiol. 2001 Jun;280(6):C1485-97.
22. Sanderson MJ, Lansley AB, Dirksen ER. *Regulation of ciliary beat frequency in respiratory tract cells*. Chest. 1992;101(3Suppl):69S-71S.
23. Shim JJ, Dabbagh K, Ueki IF, Dao-Pick T, Burgel PR, Takeyama K, Tam DC, Nadel JA. *IL-13 induces mucin production by stimulating epidermal growth factor receptors and by activating neutrophils*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2001 Jan;280(1):L134-40.
24. Uzlaner N, Priel Z. *Interplay between the NO pathway and elevated [Ca²⁺]_i enhances ciliary activity in rabbit trachea*. J Physiol. 1999 Apr 1;516(Pt 1):179-90.
25. Venkayya R, Lam M, Willkom M, Grünig G, Corry DB, Erle DJ. *The Th2 lymphocyte products IL-4 and IL-13 rapidly induce airway hyperresponsiveness*

7.Literaturverzeichnis

- through direct effects on resident airway cells.* Am J Respir Cell Mol Biol. 2002 Feb;26(2):202-8.
26. Watt WC, Lazarowski ER, Boucher RC. *Cystic fibrosis transmembrane regulator-independent release of ATP. Its implication of P2Y2 receptors in airway epithelia.* J Biol Chem. 1998 May;273(22):14053-8.
27. Wynn TA. *IL-13 effector functions.* Annu Rev Immunol. 2003 ;21 :425-56. Epub 2001 Dec 19.
28. Zuegg J, Webb DC, Foster PS, Casarotto MG. *Structural model of human IL-13 defines the spatial interactions with the IL-13Ralpha/IL-4Ralpha receptor.* Immunol Cell Biol. 2001 Aug;79(4):332-9.
29. Striegl Elisabeth. *Einfluss von IL-13 auf die mukoziliäre Funktion gemessen an Spheroiden von nasalen Epithelzellen von Allergikern und Normalpersonen nach Stimulation durch ATP.* 2008

8.Danksagung

8.Danksagung

Ein herzliches Dankeschön gilt Herrn Dr. med. F. Gamarra, der mich bei der dieser Arbeit betreute und sich stets für Fragen und Probleme Zeit für mich nahm.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich für alle Freunde und Mitarbeiter des Labors, die sich freundlicherweise für die Probenentnahme für diese Arbeit zur Verfügung stellten.

Danken möchte ich auch meinen Ehemann und meiner Familie, die mich während dieser Arbeit stets unterstützten.