

---

**Einfluss von IL-13 auf die mukoziliäre Funktion gemessen an  
Spheroïden von nasalen Epithelzellen von Allergikern und  
Normalpersonen nach Stimulation durch ATP**

Elisabeth Striegl

---

Aus der Medizinischen Klinik - Innenstadt der Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke  
Pneumologie  
Leiter: Prof. Dr. med. R. M. Huber

**Einfluss von IL-13 auf die mukoziliäre Funktion gemessen an  
Spheroïden von nasalen Epithelzellen von Allergikern und  
Normalpersonen nach Stimulation durch ATP**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilian-Universität zu München

vorgelegt von

Elisabeth Striegl  
aus München

2008

---

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. R. M. Huber

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dr. Ulrich Welsch  
Priv. Doz. Dr. Rudolf A. Jörres

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

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

Tag der mündlichen Prüfung: 13.11.2008

---

## **Meiner Mutter**

## Inhaltsverzeichnis

### 1. Einleitung

<b>1.1. Die mukoziliäre Funktion.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Konventionelle Methoden zur Untersuchung der mukoziliären Funktion</b>	
1.2.1. Die Photoverstärkermethode.....	2
1.2.2. Die digitale Highspeed-Video-Methode.....	2
1.2.3. Die Rhinoszintigraphie.....	3
1.2.4. Der Saccharin-Test.....	3
<b>1.3. Die Spheroid-Methode.....</b>	<b>3</b>
<b>1.4. Die mukoziliäre Funktion bei Allergikern.....</b>	<b>4</b>
<b>1.5. Interleukin (IL-) 13</b>	
1.5.1. Die Bedeutung von IL-13 für die allergische Rhinitis.....	4
1.5.2. Der Einfluss von IL-13 auf das respiratorische Epithel.....	7
<b>1.6. Die Wirkung von ATP auf die mukoziliäre Funktion.....</b>	<b>7</b>
<b>1.7. Fragestellung.....</b>	<b>8</b>

### 2. Materialien und Methoden

<b>2.1. Die Herstellung von Grundmedien und Agarplatten</b>	
2.1.1. Herstellung von Airway Epithelial Cell Basal Medium (AECBM).....	9
2.1.2. Herstellung von Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM).....	10
2.1.3. Herstellung der Agar-Platten.....	10
<b>2.2. Kultivierung von Sphroiden aus nasalem respiratorischen Epithel</b>	
2.2.1. Gewinnung von Nasalepithel.....	11
2.2.2. Kultivierung des nasalen respiratorischen Epithels.....	12
2.2.3. Beurteilung der entstandenen Spheroide.....	13
<b>2.3. Bestimmung der mukoziliären Funktion</b>	
2.3.1. Versuchsaufbau.....	13
2.3.2. Bestimmung der Rotationsfrequenz.....	15

### **2.4. Versuchsreihe 1: Versuche mit NPE-caged-ATP**

2.4.1. Kultivierung der Nasalepithel-Spheroide.....	16
2.4.2. Konzentrationen von NPE-caged-ATP.....	16
2.4.3. Versuchsablauf.....	17
2.4.4. Bestimmung der Rotationsfrequenz.....	19

### **2.5. Versuchsreihe 2: Versuche mit Nasalepithel-Spheroïden gesunder Probanden und Patienten mit allergischer Rhinitis nach Kultivierung mit oder ohne IL-13 und Stimulation durch freies ATP**

2.5.1. Kultur der Nasalepithel-Spheroïde mit IL-13.....	20
2.5.2. Versuchsprotokoll.....	20
2.5.3. Bestimmung der Rotationsfrequenz.....	23

### **2.6. Statistik.....24**

## **3. Ergebnisse**

### **3.1. Versuchsreihe 1: Versuche mit NPE-caged-ATP**

3.1.1. Ergebnisse der Kultur der Nasalepithel-Spheroïde.....	25
3.1.2. Vergleich der basalen Rotationsfrequenz der vier Versuchsgruppen.....	28
3.1.3. Versuchsgruppe 1: Kontrollgruppe ohne NPE-caged-ATP.....	29
3.1.4 Versuchsgruppe 2: Stimulation mit 100 µmol/l NPE-caged-ATP.....	31
3.1.5. Versuchsgruppe 3: Stimulation mit 1 mmol/l NPE-caged-ATP.....	32
3.1.6. Versuchsgruppe 4: Stimulation mit 10 mmol/l NPE-caged-ATP.....	33

### **3.2. Versuchsreihe 2: Versuche mit Nasalepithel-Spheroïden gesunder Probanden und Patienten mit allergischer Rhinitis nach Kultivierung mit oder ohne IL-13 und Stimulation durch freies ATP**

3.2.1. Kultivierung von Nasalepithel-Spheroïden aus Schleimhautabstrichen gesunder Probanden und Patienten mit allergischer Rhinitis mit und ohne Zugabe von IL-13.....	35
3.2.2. Vergleich der basalen Rotationsfrequenz.....	38
3.2.3. Ergebnisse der Versuche nach Protokoll A: Zugabe von ATP nach 120 Sekunden.....	39
3.2.4. Ergebnisse der Versuche nach Protokoll B: Zugabe von ATP nach 240 Sekunden.....	43
3.2.5. Zusammenfassung der Ergebnisse aus Protokoll A und B.....	47

## **4. Diskussion**

### **4.1. Diskussion der Methoden und Materialien**

4.1.1. Spheroïde.....	51
4.1.2. Kultur von Nasalepithel-Spheroïden.....	52
4.1.3. Versuchsaufbau und Bestimmung der Rotationsfrequenz der Nasalepithel-Spheroïde.....	52
4.1.4. Versuchsstoffe.....	55
4.1.4.1. ATP.....	55
4.1.4.1.1. NPE-caged ATP.....	56
4.1.4.1.2. Disodium-ATP.....	57
4.1.4.2. Interleukin 13.....	58

### **4.2. Diskussion der Ergebnisse in Versuchsreihe 1: Untersuchung der Stimulierbarkeit der mukoziliären Funktion mit NPE-caged-ATP**

4.2.1. Kultur von Spheroïden aus Nasalepithel gesunder Probanden.....	59
4.2.2. Basale Rotationsfrequenz der Spheroïde in Versuchsreihe 1.....	60
4.2.3. Stimulation der Rotationsfrequenz von Nasalepithel-Spheroïden durch NPE-caged-ATP in Konzentrationen von 100 µmol/l bis 10 mmol/l und Kontrolle ohne NPE-caged-ATP .....	60

<b>4.3. Diskussion der Ergebnisse in Versuchsreihe 2: Versuche mit Nasalepithel-Spheroiden gesunder Probanden und Patienten mit allergischer Rhinitis nach Kultivierung mit oder ohne IL-13 und Stimulation durch freies ATP</b>	
4.3.1. Kultur von Nasalepithel-Spheroiden gesunder Probanden und allergischer Patienten mit und ohne IL-13.....	64
4.3.2. Vergleich der basalen Rotationsfrequenz.....	65
4.3.3. Stimulation der Rotationsfrequenz durch Disodium-ATP.....	66
4.3.3.1. Kontrollmessungen mit DMEM.....	66
4.3.3.2. Stimulation durch Disodium-ATP.....	67
<b>5. Zusammenfassung</b>	
5.1. Ziele.....	70
5.2. Zusammenfassung der Ergebnisse.....	71
5.3. Schlussfolgerung.....	72
5.4. Ausblick auf zukünftige Fragestellungen.....	73
<b>6. Abkürzungen.....</b>	<b>74</b>
<b>7. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>75</b>
<b>8. Danksagung.....</b>	<b>85</b>
<b>9. Lebenslauf.....</b>	<b>86</b>



### 1. Einleitung

In der vorliegenden Arbeit sollte anhand von humanen Nasalepithel-Spheroiden gesunder Probanden und Patienten mit allergischer Rhinitis untersucht werden, ob IL-13 die mukoziliäre Funktion und ihre Stimulierbarkeit durch ATP beeinflusst.

Dazu wurde die Rotationsfrequenz von Nasalepithel-Spheroiden als Parameter für die mukoziliäre Funktion verwendet.

Im folgenden Kapitel soll ein Überblick über herkömmliche Methoden zur Beurteilung der mukoziliären Funktion und das Spheroidmodell gegeben werden. Außerdem wird auf die Bedeutung der Allergie und den Einfluss von IL-13 und ATP auf die mukoziliäre Funktion eingegangen.

#### 1.1. Die mukoziliäre Funktion

Die mukoziliäre Funktion wird vom Flimmerepithel ausgeführt, das die Nasenschleimhaut, den Epipharynx und den unteren Respirationstrakt von der Trachea bis in die Bronchioli terminales ausgekleidet. Sie hat die Aufgabe, eingeatmete Partikel und Krankheitserreger aus den Atemwegen abzutransportieren und stellt so einen wichtigen Abwehrmechanismus der Atemwege dar (36, 75). Die mittlere mukoziliäre Funktion in der Nase erfolgt mit einer Geschwindigkeit von ca. 4,3 mm/sec (64). Dabei ist zum einen der Mukus von Bedeutung: Er wird von Becherzellen und Glandulae bronchiales sezerniert und besteht aus glykosilierten Muzin-Makromolekülen. Die richtige Zusammensetzung des Mukus und somit eine optimale Viskoelastizität ist für die mukoziliäre Funktion von großer Bedeutung (20, 60, 62, 75).

Zum anderen ist das Schlagen der Zilien eine wichtige Komponente der mukoziliären Funktion: Die eingeatmeten Partikel und Erreger bleiben auf dem Mukus haften, der durch das Schlagen der Zilien richtung Pharynx transportiert wird (20). Beim Schlagen bewegen sich die Zilien in der periziliären Flüssigkeit, einer niedrigviskösen Lösung, die von Clarazellen sezerniert und deren Zusammensetzung von den Zellen des respiratorischen Epithels moduliert wird (10, 36, 44). Nur die Spitzen der Zilien ragen in den auf der periziliären Flüssigkeit schwimmenden Mukus und transportieren durch ihr Schlagen den

Mucus und die periziliäre Flüssigkeit (36, 44). Kalziumoszillationen koordinieren das Schlagen der Zilien (17, 18): Die Zilien der Nasenschleimhaut schlagen in metachronen Wellen mit einer Frequenz von 8-11 Hz (11, 31, 32). Der synchrone Ablauf des Zilienschlages ist entscheidend für die Effektivität.

Die ziliäre Schlagfrequenz kann einerseits durch bestimmte Noxen wie z. B. Dieselabgase vermindert und andererseits z. B. durch sympathomimetische Substanzen oder ATP erhöht werden (12, 49, 63).

### **1.2. Konventionelle Methoden zur Untersuchung der mukoziliären Funktion**

Die mukoziliäre Funktion kann mit verschiedenen Methoden beurteilt werden. Im Folgenden sollen vier konventionelle Methoden, sowie das in dieser Arbeit verwendete Spheroid-Modell kurz dargestellt werden:

#### **1.2.1. Die Photoverstärkermethode**

Bei der Photoverstärkermethode werden die entnommenen Proben des respiratorischen Epithels oder das als adhärenter Monolayer kultivierte respiratorische Epithel in ein Medium gebracht, dem die Testsubstanzen zugegeben werden. Die zu untersuchende Probe steht unter einem Mikroskop und wird von Licht durchstrahlt. Das Schlagen einzelner fokussierter Zilien verursacht Schwankungen der Lichtintensität. Diese Schwankungen werden über einen Photodetektor an einen PC weitergeleitet. Mittels Fast Fourier Transformation werden die Intensitätsschwankungen des Lichtes auf dem Computer in ein Frequenzspektrum umgewandelt, über das die ziliäre Schlagfrequenz ermittelt wird (8).

#### **1.2.2. Die digitale Highspeed-Video-Methode**

Hier wird der Zilienschlag einer Monolayer-Kultur über ein Mikroskop und eine daran angeschlossene Highspeed-Videokamera gefilmt. Dabei werden bis zu 500 Aufnahmen pro Sekunde gemacht. Durch langsames Vorspulen kann dann die ziliäre Schlagfrequenz ermittelt

werden. Zusätzlich zur Messung der Frequenz kann hier auch der Ablauf des Zilienschlages direkt beobachtet werden (8, 81).

### 1.2.3. Die Rhinoszintigraphie

Mit der Rhinoszintigraphie wird die mukoziliäre Funktion in vivo bestimmt. Dazu tropft man Probanden eine Lösung mit Tc-99m-Albumin in den unteren Nasengang. Der mukoziliäre Transport des Tc-99m-Albumin wird über eine Gammakamera verfolgt und die Transportgeschwindigkeit errechnet (64).

### 1.2.4. Der Saccharin-Test

Eine weitere Methode zur Messung der mukoziliären Funktion in vivo stellt der Saccharin-Test dar: Dabei wird ein Saccharin-Stückchen auf der Concha nasalis inferior plaziert und die Zeit bestimmt, nach der die Probanden den Geschmack des Saccharins wahrnehmen. Diese beträgt in der Regel 12-15 Minuten (24, 35).

### 1.3. Die Spheroid-Methode

Diese Methode wurde in unserem Labor etabliert, wie später im Detail erklärt werden wird. Zunächst wird ein Bürstenabstrich von respiratorischem Epithel in flüssigem Medium mit eigenem Mukus kultiviert. Dabei lagern sich die abgebürsteten Epithelstreifen zu kugeligen Gebilden, den sogenannten Spheroiden, zusammen. Aufgrund des koordinierten, in eine Richtung weisenden Schlages der Zilien auf ihrer Oberfläche rotieren die Spheroide in ihrem eigenen Mukus um ihre Achse. Die Rotationsfrequenz der Spheroide wird als Parameter für die mukoziliäre Funktion gewertet. Zur Bestimmung der Rotationsfrequenz werden die Spheroide unter einem Mikroskop beobachtet und ihre Bewegung auf Video aufgezeichnet. Durch langsames Vorspulen der Videoaufzeichnung wird dann die Rotationsfrequenz der Spheroide bestimmt.

### 1.4. Die mukoziliäre Funktion bei Allergikern

Die allergische Rhinitis stellt ein ausgesprochen häufiges Krankheitsbild dar. Sie zählt zu den Erscheinungsformen der Atopie, ebenso wie die häufig bei Patienten mit allergischer Rhinitis auftretende Dermatitis atopica und das allergische Asthma bronchiale. Nach Sensibilisierung werden IgE-Antikörper gegen individuell verschiedene Allergene gebildet und über IgE-Rezeptoren auf Mastzellen gebunden. Bei erneutem Kontakt mit dem Allergen kommt es nach Bindung des Allergens an das IgE zur Degranulation der Mastzelle. Dabei werden Histamin, Interleukine und weitere Cytokine freigesetzt. Diese Mediatoren vermitteln über ihre Wirkung an Blutgefäßen, exokrinen Drüsen und Nervenfasern die Ausbildung der typischen Symptome der allergischen Rhinitis wie Niesen, Rhinorrhoe und behinderte Nasenatmung (26, 38, 77). Welche Auswirkungen die allergische Rhinitis und die an ihrer Genese beteiligten Mediatoren auf die mukoziliäre Funktion der Nasenschleimhaut haben, ist jedoch noch nicht bis ins Detail bekannt.

Die Arbeitsgruppe um Adam Wanner zeigte, dass die ziliäre Schlagfrequenz bei gesunden und allergischen Schafen gleich ist (74). Bayram fand bei in vitro Versuchen heraus, dass sich auch beim Menschen die ziliäre Schlagfrequenz von Allergikern und Gesunden nicht unterscheidet (4). Andererseits wird eine mukoziliäre Dysfunktion bei Allergikern beschrieben (3, 52, 73), die durch die oben genannten Untersuchungen nicht auf eine Verminderung der ziliären Schlagfrequenz zurückzuführen ist (74).

### 1.5. Interleukin (IL-) 13

#### 1.5.1. Die Bedeutung von IL-13 für die allergische Rhinitis (s. Abbildung 1)

Wie oben erwähnt, kommt es im Rahmen einer allergischen Reaktion zur Ausschüttung bestimmter Mediatoren, unter anderem IL-13. Bei IL-13 handelt es sich um ein Zytokin der TH2-Immunantwort (6, 66). Es wird vor allem von Mastzellen und aktivierten T-Lymphozyten gebildet, insbesondere von CD 4-positiven TH2-Lymphozyten und in geringerem Maß von TH1-Lymphozyten, CD 8-positiven Zellen sowie von Keratozyten, basophilen Granulozyten und allen CD3-positiven Zellen (6, 53, 71, 78). Die Wirkung von

## 1. Einleitung

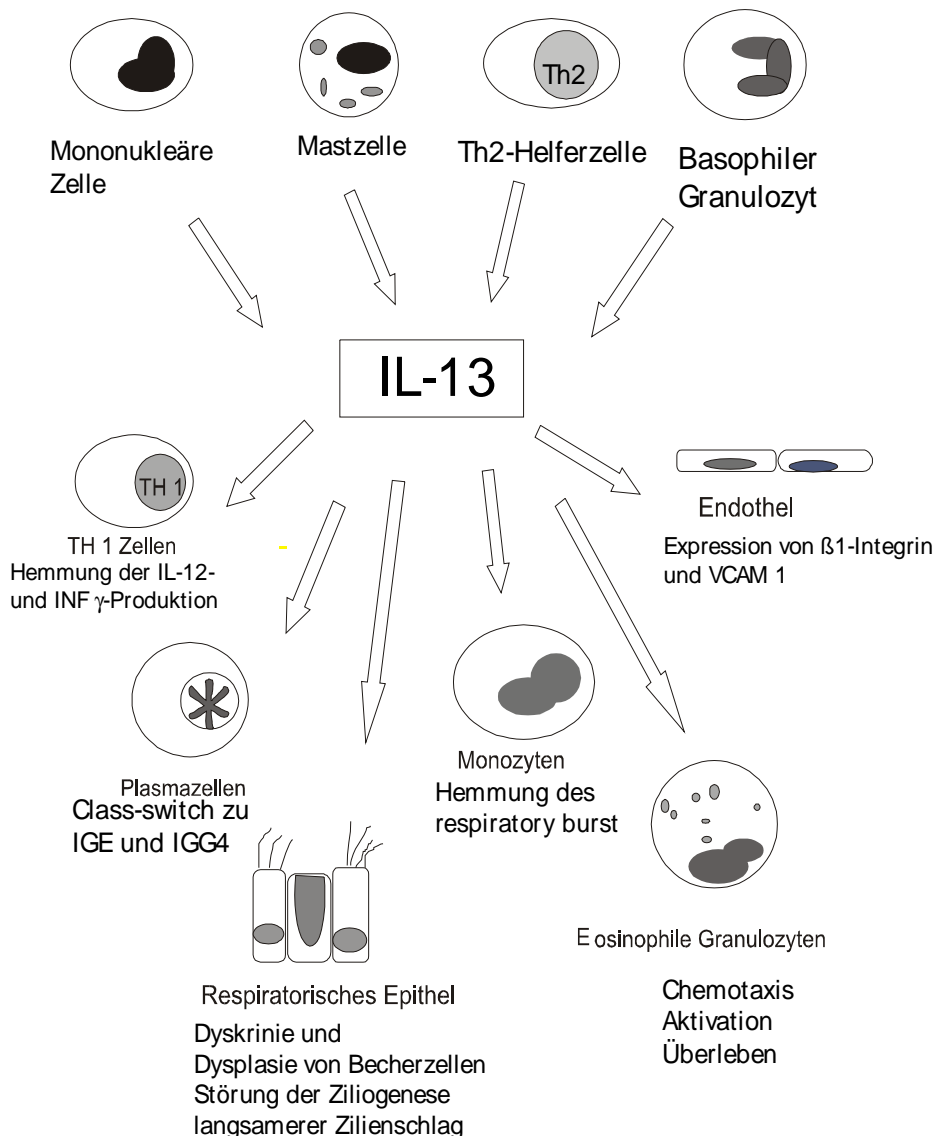
---

IL-13 an den Zielzellen wird über den IL-13-Rezeptor vermittelt. Da der IL-13-Rezeptor zur Hälfte von der IL-4-Rezeptor- $\alpha$ -Kette gebildet wird, ist auch IL-4 in der Lage, an den IL-13-Rezeptor zu binden und auf die Zelle zu wirken (13, 28). Dies zeigt die enge Beziehung dieser beiden Zytokine und ihre gemeinsame Rolle bei der Entstehung einer Allergie (71).

Seine physiologische Rolle hat IL-13 in der TH2-Immunantwort bei der Abwehr von Ektoparasiten, gastrointestinalen Parasiten, sowie in der Gegenregulierung der TH1-Immunantwort (19).

Zu den Effekten von IL-13 gehören: Class-switch zur IgE-Produktion in Plasmazellen (6, 56), Expression von MHC II-Molekülen auf B-Zellen und Monozyten (28), sowie VCAM-Expression am Endothel (2, 14, 67). Über die Produktion von Chemokinen veranlasst IL-13 die Einwanderung eosinophiler Granulozyten und Mastzellen ins Gewebe. Durch diese Pathomechanismen stellt IL-13 auch einen zentralen Mediator der allergischen Immunantwort Typ 1 dar (38, 56, 80) und ist entscheidend an der Entwicklung von allergischem Asthma bronchiale und der allergischen Rhinitis sowie weiterer Erkrankungen des allergischen Formenkreises beteiligt. Bei Patienten mit allergischer Rhinitis wurden erhöhte IL-13-Spiegel im Blut festgestellt (2). Rezeptoren für IL-13 wurden vermehrt in Zellen des nasalen respiratorischen Epithels von Allergikern nachgewiesen (2, 43).

## 1. Einleitung



**Abbildung 1** zeigt schematisch die Sekretion und Wirkung von IL-13:

IL-13 wird von mononukleären Zellen, Mastzellen, TH2-Zellen und basophilen Granulozyten sezerniert. Es bewirkt bei TH1-Zellen eine Hemmung der IL-12- und INF  $\gamma$ -Produktion. Bei Plasmazellen wird durch IL-13 ein class-switch zur Produktion von IgE und IgG4 herbeigeführt. An Zellen des respiratorischen Epithels führt IL-13 zu einer vermehrten Schleimsekretion, Dysplasie der Becherzellen sowie zu einer Störung der Ziliogenese und Verlangsamung des Zilienschlages. In Monozyten wird durch IL-13 der respiratory burst gehemmt, Endothelzellen exprimieren unter dem Einfluss von IL-13  $\beta$ 1-Integrin und VCAM 1. Eosinophile Granulozyten werden chemotaktisch angezogen, aktiviert und ihr Überleben verlängert (2, 6, 14, 53, 56, 58, 71, 78).

### 1.5.2. Der Einfluss von Interleukin 13 auf das respiratorische Epithel

IL-13 ist in der Lage, eine Überproduktion von Mukus, eine allergeninduzierte Hyperreagibilität und Eosinophilie, sowie einen fibrotischen Umbau der Atemwege und eine erhöhte Resistance hervorzurufen (38, 71, 72).

Es wird vermutet, dass IL-13 auch direkt, ohne Vermittlung über eosinophile Granulozyten, auf Zellen des respiratorischen Epithels wirkt und auf diese Weise die Schleimproduktion erhöht (38). Laoukili berichtet von einem negativen Einfluss von IL-13 auf die Ziliogenese und die ziliäre Schlagfrequenz (39).

So kann man annehmen, dass IL-13 auch die mukoziliäre Funktion in der Nase beeinflusst.

### 1.6. Die Wirkung von ATP auf die mukoziliäre Funktion

ATP spielt bei vielen Vorgängen im menschlichen Körper eine wichtige Rolle. Unter anderem bei der Regulation der mukoziliären Funktion: In vivo wird ATP parakrin von den Zellen des respiratorischen Epithels sezerniert (25, 40, 51, 76, 82). Es vermittelt, ebenso wie andere 5' Nukleotide, die Reaktion der mukoziliären Funktion auf intraluminalen Stress (13, 23, 25, 61, 76): ATP gilt als potenter Stimulus der ziliären Schlagfrequenz, der diese um das 2-3-fache erhöhen kann (42, 49, 61). Außerdem steigert ATP die Chloridsekretion der Epithelzellen und die Mukus-Degranulation aus Becherzellen (23, 25, 41). Die Antwort des respiratorischen Epithels auf ATP wird über zwei Purinozeptoren, den P2Y- und den P2X-Rezeptor, vermittelt. Beim P2Y-Rezeptor erfolgt die Signaltransduktion an ein G-Protein gekoppelt über die Aktivierung von Phospholipase C. In der weiteren Signalkaskade wird über IP3 Kalzium aus dem endoplasmatischen Retikulum freigesetzt. Über einen von DAG geöffneten Kalzium-Kanal strömt Kalzium auch von außen in die Zelle. Auch eine Beteiligung von NO an der Signaltransduktion wurde beschrieben (48, 49, 69). Zusätzlich werden auch der Ablauf und die Amplitude der Kalzium-Oszillationen erhöht (17, 18). Der genaue Mechanismus, über den Kalzium den Zilienschlag beschleunigt, ist noch nicht bekannt. Man vermutet eine Vermittlung durch Calmodulin (17, 18).

Bei P2X-Rezeptoren handelt es sich um Ionenkanäle (37). Durch Bindung von ATP wird eine Pore geöffnet und es entsteht ein Ionenkanal für Natrium, Kalium und Kalzium. Neben der Erhöhung des intrazellulären Kalzium-Spiegels scheint auch der Ausstrom von Kalium durch

## 1. Einleitung

---

kalzium-aktivierte Kanäle und die dadurch entstehende Membran-Hyperpolarisation eine Rolle für die Steigerung der ziliären Schlagfrequenz zu spielen (42, 65). Auf welche Art jedoch diese Membran-Hyperpolarisierung die ziliäre Aktivität steigert, ist bisher ungeklärt (48).

Zusammenfassend erhöht ATP die ziliäre Schlagfrequenz, modifiziert durch Steigerung der Chlorid- und Wassersekretion die Zusammensetzung des Mukus und der periziliären Flüssigkeit und optimiert somit die mukoziliäre Funktion.

### 1.7. Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss von IL-13 auf die mukoziliäre Funktion und ihre Stimulierbarkeit durch ATP an Nasalepithel-Spheroide von gesunden Probanden und Patienten mit allergischer Rhinitis untersucht werden. Im Rahmen dieser Untersuchung stellten sich folgende Fragen:

1. Ist es möglich, aus respiratorischem Epithel der Nase rotierende Spheroide zu kultivieren?
2. Gibt es Unterschiede in der basalen Rotationsfrequenz der Nasalepithel-Spheroide von gesunden Probanden und Patienten mit allergischer Rhinitis?
3. Kann die Rotationsfrequenz der Nasalepithel-Spheroide von gesunden Probanden und Patienten mit allergischer Rhinitis durch ATP gesteigert werden?
4. Hat IL-13 einen Einfluss auf die Kultur von Nasalepithel-Spheroide?
5. Wie wirkt sich die Kultur mit IL-13 auf die basale oder stimulierte Rotationsfrequenz der Nasalepithel-Spheroide gesunder Probanden und Patienten mit allergischer Rhinitis aus?



## 2. Materialien und Methoden

### 2.1. Die Herstellung von Grundmedien und Agarplatten

Zunächst sollen grundlegende Methoden zur Kultur von respiratorischem Epithel, welche die Voraussetzung für die Kultivierung von Nasalepithel-Spheroiden sind, erläutert werden. Jeder der im Folgenden beschriebenen Arbeitsschritte erfolgte unter sterilen Bedingungen und unter einem Arbeitsplatzabzug (Laminar Airflow, HB 24725, Fa. Haereus, München).

#### 2.1.1. Herstellung von Airway Epithelial Cell Basal Medium (AECBM)

In 500 ml AECBM-Grundlösung (#C-21260, Fa. Promo Cell, Heidelberg) wurde der Inhalt der Supplement-Packung ( #C39160, Fa. Promo Cell, Heidelberg) gegeben:

- 2 ml Rinder-Hypophysenextrakt
- 0,5 µg/ml EGF (humaner rekombinanter Epidermal Growth Factor)
- 5,0 mg /ml Rinder-Insulin
- 500 µg/ml Hydrocortison
- 500 mg/ml Epinephrin
- 6,5 ng/ml Trijodthyronin
- 10 mg/ml Transferrin
- 100 ng/ml Retinolsäure

Weitere Zusätze für das AECBM waren:

- Penicillin-Streptomycin (Penstrep ® #15140114 Fa. Life Technologies GmbH, Karlsruhe) mit einer Endkonzentration von Penicillin 10 U/ml und Streptomycin 10 µg/ml
- Amphotericin B ( Funginzone ® #15290-026, Fa. Life Technologies GmbH, Karlsruhe) mit einer Endkonzentration von 1µg/ml
- 10 % NCS ( Neugeborenen Kälberserum, hitzedenaturiert, #26010-041, Fa. Life Technologies GmbH, Karlsruhe)

Die fertige Nährlösung konnte bei 4 °C über zwei Wochen gelagert werden.

### 2.1.2. Herstellung von Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM)

Eine doppelt konzentrierte DMEM-Lösung (Dulbecco`s Modified Eagle Medium, Pulver, #52100-021, Fa. Life Technologies GmbH, Karlsruhe) wurde mit HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperacin-N-2-Ethansulfonsäure, Pulver, #11344-025, Fa. Life Technologies GmbH, Karlsruhe) gepuffert und ein pH-Wert von  $7,3 \pm 0,1$  eingestellt. Mit Hilfe eines Bakterienfilters (Minisart, Porengröße  $0,2 \mu\text{m}$ , #16534, Fa. Sartorius AG, Göttingen) wurde die Lösung steril filtriert und bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  aufbewahrt.

### 2.1.3. Herstellung der Agar-Platten

2,25 g Agarpulver (Agar noble, Pulver, #214220, Fa. Becton Dickinson, Sparks, USA) wurden in 150 ml Aqua dest. bei  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  gelöst. Diese fertige Agarlösung wurde anschließend in Aliquots zu je 30 ml aufgeteilt und autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurde der Agar bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

Zum Herstellen von 10 Agarplatten wurde folgendes Medium vorbereitet:

30 ml doppelt konzentriertes DMEM

+ 75  $\mu\text{l}$  nichtessentielle Aminosäuren (# 11140-035, Fa. Life Technologies GmbH, Karlsruhe),

+ 6 ml NCS (Neugeborenes Kälberserum, hitzedenaturiert, #26010-041, Fa. Life Technologies GmbH, Karlsruhe)

+ 120  $\mu\text{l}$  Penstrep® (Penicillin, Streptomycin, 10000 IU/ml – 10000  $\mu\text{g/ml}$ , #15140-114, Fa. Life Technologies GmbH, Karlsruhe)

+ 240  $\mu\text{l}$  Fungizone® (Amphotericin B, 250  $\mu\text{g/ml}$ , #15290-026, Fa. Life Technologies GmbH, Karlsruhe)

Ein Aliquot Agar (30 ml) wurde in der Mikrowelle erwärmt bis der Agar flüssig wurde. Nachdem der Agar etwas abgekühlt war, wurde er mit dem vorbereiteten Medium (s.o.) vermischt. Die fertige Lösung wurde mit Hilfe einer 5 ml Pipette in die Wells der Gewebekulturplatten (24 Well Companion Platten 16,5 mm Durchmesser #3504 Fa. Labor Schubert und Weiss, München) verteilt. In jedes Well wurden 0,2 ml Agar gegeben. Die fertigen Agarplatten wurden verpackt und bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

### 2.2. Kultivierung von Sphroiden aus nasalem respiratorischen Epithel

#### 2.2.1. Gewinnung von Nasalepithel

Eine Genehmigung der Ethikkommission der LMU München lag für die Entnahme von respiratorischem Epithel zu Forschungszwecken vor.

Das respiratorische Epithel wurde von freiwilligen Probanden und von Patienten, die der Probenentnahme zugestimmt hatten, mit einer Zytologiebürste aus dem unteren Nasengang entnommen. Hierzu wurde die Bürste in ihrer Hülle in den unteren Nasengang eingeführt. Anschließend wurde die Bürste aus der Hülle geschoben und an der Wand des Nasenganges vor und zurück bewegt. Die auf diese Weise abgebürsteten Zellen, Epithelstreifen und der Schleim wurden von der Bürste in ein Zentrifugenröhrchen (14 ml, #188 261 Fa. Greiner Labortechnik, Solingen) mit physiologischer Kochsalzlösung (0,9 % Natriumchloridlösung von Braun) abgestreift. Dies erfolgte durch wiederholtes Hereinziehen und Herausschieben der Bürste aus ihrer Hülle.

Allgemeine Ausschlusskriterien waren Rauchen oder ein akuter respiratorischer Infekt. Gesunde Probanden sollten keine chronische Atemwegserkrankung, insbesondere keine allergische Rhinitis in der Anamnese haben. Außerdem sollte ihr Intracutantest (Pricktest) auf folgende Allergene negativ sein: Gräsermischung, Roggen, Birke, Hasel, Erle, Buche, Eiche, Esche, Beifuss, Spitzwegerich, Dermatophagoides pteronyssinus und farinae, Hundehaare, Katzenhaare, Pferdehaare, Alternaria alternata, Aspergillus fumigatus, Cladosporium herbarum.

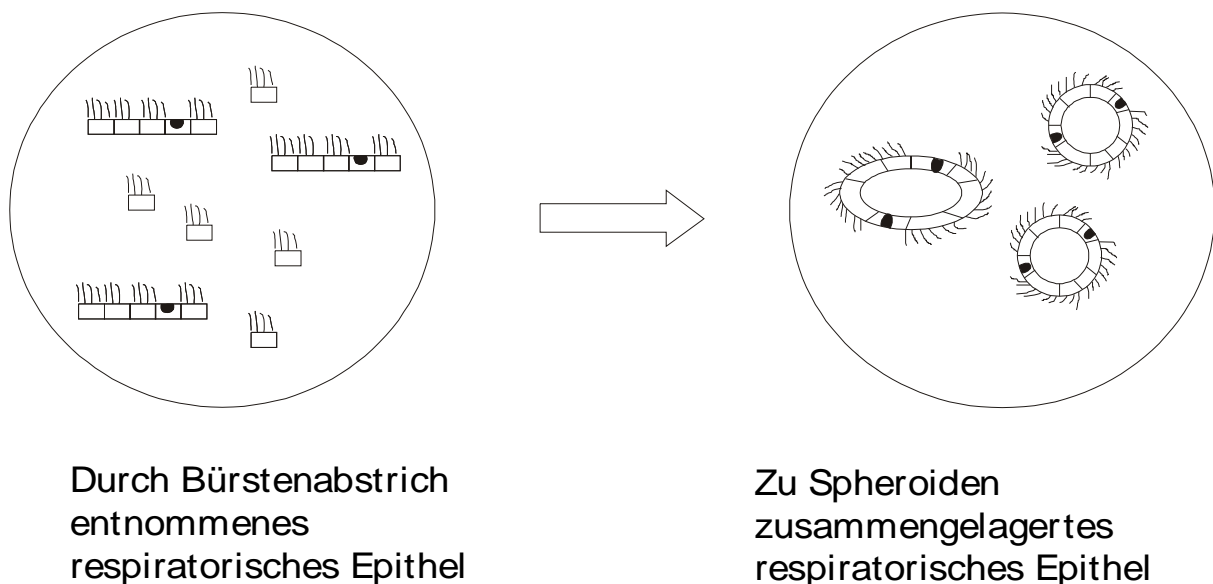
Für Patienten mit allergischer Rhinitis wurden folgende Einschlusskriterien angewandt: Allergische Rhinitis in der Anamnese und positiver Intracutantest auf eines der oben genannten Allergene mit positiver Reaktion, das heißt, mit einer Infiltration von ca. 5 mm Durchmesser. Andere chronische Atemwegserkrankungen durften nicht vorliegen. Die Probenentnahme erfolgte nicht während akuter allergischer Rhinitis.

### 2.2.2. Kultivierung des nasalen respiratorischen Epithels

Das durch Bürstenabstrich aus der Nase gewonnene Material, bestehend aus Schleim, sowie einzelnen Zellen und Streifen von respiratorischem Epithel, wurde zweimal in AECBM gewaschen und auf agarbeschichtete Gewebekulturplatten überführt. Die Agarbeschichtung verhinderte ein adhärentes Wachstum des respiratorischen Epithels am Boden der Gewebekulturplatten. Das bei einem Abstrich entnommene Material wurde auf vier Wells aufgeteilt. Zusätzlich wurde in jedes Well 100 µl AECBM gegeben, so dass die Bürstenabstriche in flüssiger Lösung auf dem Agar schwammen.

Anschließend wurden die Proben im Brutschrank (Typ B 5060 EC/CO<sub>2</sub>, Heraeus, Hanau, Deutschland) bei 37 C° mit 5 % CO<sub>2</sub> und nahezu 100 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Jeden zweiten Tag wurden 50 µl des AECBM abpipettiert und durch frisches Medium ersetzt.

Nach einigen Stunden in Kultur hatten sich die ersten Spheroide gebildet, die in dem sie umgebenden Schleim rotierten.



**Abbildung 2** zeigt schematisch die Zusammenlagerung der Nasalepithel-Streifen eines Bürstenabstriches zu Nasalepithel-Spheroiden.

### 2.2.3. Beurteilung der entstandenen Spherioide

Die Proben wurden täglich phasenkontrastmikroskopisch kontrolliert. Dabei wurde auf das ausreichende Vorhandensein von Medium und bakterielle Verunreinigungen geachtet.

Außerdem wurden die entstandenen Spherioide beurteilt: Die Spherioide jedes einzelnen Wells wurden gezählt und der Anteil der rotierenden Spherioide ermittelt. Die Menge des Schleims wurde semiquantitativ bestimmt.

Im Mittel hatten sich nach fünf Tagen in Kultur ausreichend Spherioide für die Bestimmung der Rotationsfrequenz gebildet. Wenn nach sieben Tagen noch keine rotierenden Spherioide entstanden waren, wurde die Probe verworfen.

### 2.3. Bestimmung der mukoziliären Funktion

Die Rotationsgeschwindigkeit der Spherioide wurde als Parameter für die mukoziliäre Funktion verwendet. Die Rotationsfrequenz der Spherioide ist, wie die mukoziliäre Funktion *in vivo*, vom Schlagen der Zilien und der Zusammensetzung des Mukus abhängig.

#### 2.3.1. Versuchsaufbau (s. Abbildung 3)

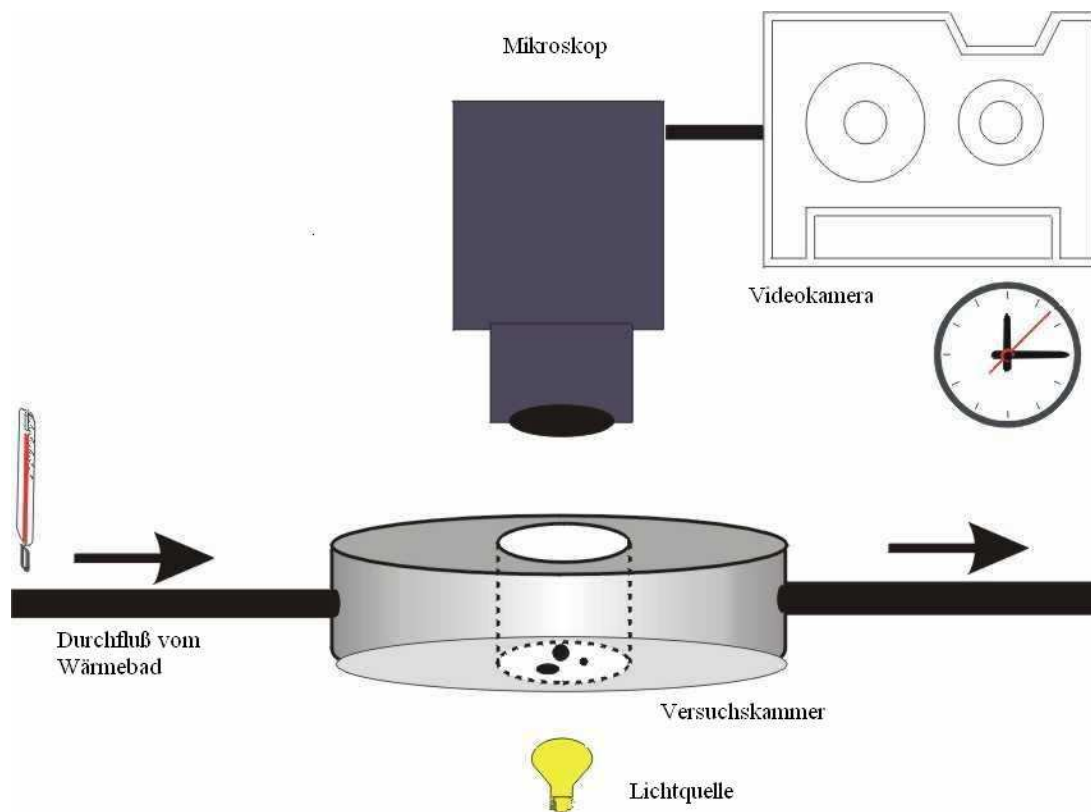
Für die Bestimmung ihrer Rotationsfrequenz wurden die Spherioide in eine eigens dafür entwickelte Versuchskammer gebracht. Bei der Versuchskammer handelte es sich um eine doppelwandige Metallkammer (siehe Abbildung 3), in deren Mitte sich die eigentliche Versuchskammer befand. Als Boden für diese innere Kammer wurde vor jedem Versuch ein Deckgläschen (Durchmesser 15 mm, Stärke 3 #1001 Fa. Schultheiss) mit Silikon-Paste (Baysilone mittelviskös, #3501 12071 Fa. Bayer über Fa. Labor Schubert und Weiss, München) eingeklebt. Zum Schutz vor Verdunstung wurde die Kammer mit einem weiteren Deckgläschen abgedeckt. Mit ihrem gläsernen Boden wurde die Kammer auf ein Phasenkontrastmikroskop (Stemi 2000C Fa. Carl Zeiss, Jena; Mikroskoplampe, NAG G/281243 40 V A, Fa. Carl Zeiss, Jena) gestellt.

## 2. Materialien und Methoden

---

Die Kammer war durch Schläuche mit einem Wärmebad ( Fa. GFL) verbunden, das etwa dreißig Minuten vor Versuchsbeginn temperiert wurde. Mit Hilfe einer Pumpe ( BP742 Fa. Fresenius Apparatebau, Bad Homburg) wurde erwärmtes Wasser durch die doppelte Außenwand der Kammer gepumpt, so dass in der inneren Kammer konstant eine Temperatur von  $35 \pm 0,5$  °C gehalten werden konnte. Die Temperatur konnte über ein fest in der inneren Kammer installiertes Messgerät (GTH 1200, Fa. Greisinger Elektronik) kontrolliert und bei Bedarf über Veränderung der Temperatur im Wärmebad und Änderung Durchlaufgeschwindigkeit nachreguliert werden.

Das Mikroskop, auf dem die Versuchskammer stand, war an eine Videokamera angeschlossen, so dass die Rotation der Spheroide auf Video aufgezeichnet werden konnte (Videokamera Typ EB 512, Fa. Ebro; Videorekorder, Ag7350, Fa. Panasonic, Monitor, WV BM1400, Fa. Panasonic, Titler, FX Titler WJ-AVE 1).



**Abbildung 3** zeigt den Versuchsaufbau zur Bestimmung der Rotationsfrequenz von Nasalepithel-Spheroiden.

### 2.3.2. Bestimmung der Rotationsfrequenz

Während der Versuche wurde die Rotation der Spheroide gefilmt und anschließend offline ausgewertet. Dazu wurde die Zeit, die ein Spheroid für eine Drehung um seine Achse benötigte, gemessen.

Die Rotationsfrequenz ( $R$ ) lässt sich aus der Zeit ( $t$ ), die für eine bestimmte Anzahl von Umdrehungen ( $U$ ) benötigt wird, nach folgender Formel berechnen:

$$R = U:t$$

### 2.4. Versuchsreihe 1: Versuche mit NPE-caged-ATP

In den folgenden Versuchen sollte die Wirkung von NPE-caged-ATP auf die Rotationsfrequenz von Nasalepithel-Spheroïden untersucht werden.

Bei caged-probes handelt es sich um Moleküle, deren chemische Wirksamkeit im Grundzustand durch Bindung von Seitengruppen, sogenannten caging-groups, blockiert ist. Durch Bestrahlung mit UV-Licht erfolgt in einer photochemischen Reaktion die Abspaltung der caging-group und die Substanz liegt in ihrer chemisch wirksamen Form vor. Das für diese Arbeit verwendete caged-ATP (Adenosine 5`-Triphosphat, P<sup>3</sup>- (1-(2-Nitrophenyl)ethyl) Ester, Disodium Salt , #A-1048, Fa. Mobitec, Göttingen) war an eine (1-(2-Nitrophenyl)ethyl) Ester-Gruppe gebunden, die durch Bestrahlung mit UV-Licht einer Wellenlänge von 365 nm abgespalten werden konnte.

#### 2.4.1. Kultivierung der Nasalepithel-Spheroïde

Die Kultivierung der Nasalepithel-Spheroïde erfolgte nach der oben beschriebenen Methode. Verwendet wurde ausschließlich Nasalepithel von gesunden Probanden.

#### 2.4.2. Konzentrationen von NPE-caged-ATP

Verschiedene Arbeitsgruppen untersuchten den Effekt von ATP auf die mukoziliäre Funktion und zeigten, dass es nach Gabe von ATP zu einer dosisabhängigen Steigerung der ziliären Schlagfrequenz kommt. In diesen Untersuchungen wurden Konzentrationen von extrazellulärem ATP im Bereich von 10 µmol/l bis 1 mmol/l (37, 49, 50, 65, 81) verwendet. Darum wurden die folgenden Versuche in vier Gruppen durchgeführt:

- 1) Versuche ohne NPE-caged-ATP als Kontrolle
- 2) Versuche mit 100 µmol/l NPE-caged-ATP
- 3) Versuche mit 1 mmol/l NPE-caged-ATP
- 4) Versuche mit 10 mmol/l NPE-caged-ATP



## 2. Materialien und Methoden

---

Als Medium für die Versuche wurde DMEM (Dulbecco`s Modified Eagle Medium, #22320-014 Fa. Life Technologies GmbH, Karlsruhe) verwendet.

Weil die caged-ATP-Lösung in der Versuchskammer im Verhältnis 1:1 mit dem DMEM, in dem die Spheroide transportiert wurden, gemischt wurde, mussten folgende Verdünnungen von ATP in DMEM vorbereitet werden:

- 1) Für die Kontrollen wurde DMEM verwendet
- 2) 200  $\mu\text{mol/l}$  caged-ATP in DMEM
- 3) 2  $\text{mmol/l}$  caged-ATP in DMEM
- 4) 20  $\text{mmol/l}$  caged-ATP in DMEM

Sämtliche Arbeitsschritte zur Verdünnung des NPE-caged-ATP erfolgten in einem abgedunkelten Raum. Die Kryoröhrchen (Cryo Vials, #121 277, Fa Greiner Labortechnik, Solingen), in denen die Aliquots eingefroren wurden, waren zum Schutz vor Licht mit Alufolie umwickelt.

Für die Kontrollen wurde einfaches DMEM verwendet. Vor jedem Versuch wurden die benötigten Aliquots frisch aufgetaut und im Wärmebad auf 35 °C erwärmt.

### 2.4.3. Versuchsablauf

Die Nasalepithel-Spheroide wurden mit 100  $\mu\text{l}$  DMEM in die vorbereitete Versuchskammer versetzt.

Anschließend wurden 100  $\mu\text{l}$  einer Lösung von NPE-caged-ATP in DMEM hinzugefügt. Die Konzentration des NPE-caged-ATP in der Kammer betrug entsprechend der zugefügten NPE-caged-ATP-Lösung nach Randomisierung jeweils 0,1  $\text{mmol/l}$ , 1  $\text{mmol/l}$  oder 10  $\text{mmol/l}$  bzw. in der Kontrollgruppe kein NPE-caged-ATP.

Um eine vorzeitige Aktivierung des NPE-caged-ATP zu verhindern, wurde die Lichtquelle des Phasenkontrastmikroskops durch einem UV-Filter (Yellow P001 13500, Fa. Cokin, Paris) abgedeckt. Ein weiterer UV-Filter wurde auf die Versuchskammer gelegt. Zusätzlich war während der Versuche der Raum abgedunkelt.

## 2. Materialien und Methoden

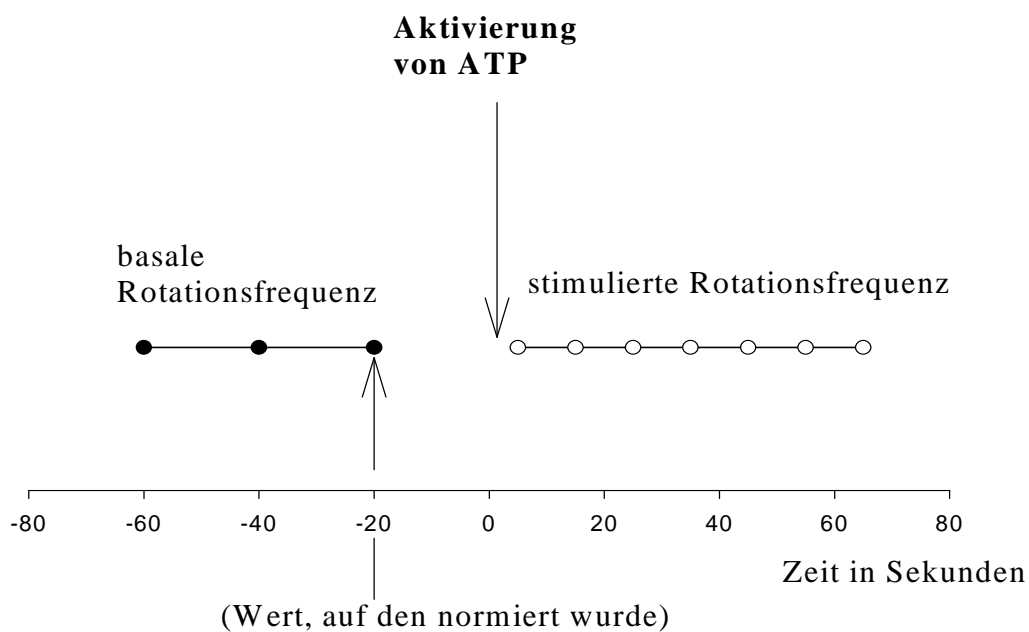
---

Nach einer Adaptationszeit von fünf Minuten wurde die Rotation der Spheroide über zwei Minuten, je eine Minute vor und eine Minute nach Aktivierung des NPE-caged-ATP, auf Video aufgezeichnet.

Zur Aktivierung des NPE-caged-ATP wurde der Inhalt der Versuchskammer 10 Sekunden lang mit UV-Licht einer Wellenlänge von 365 nm bestrahlt (UV-Lampe # 2950600, Fa. Herolab GmbH, Wiesloch, Wellenlänge 254/365 nm). Um die Proben besser bestrahlen zu können, war eine Seite der Außenwand der Versuchskammer leicht abgesenkt.

Die Versuche wurden in allen vier Versuchsgruppen nach folgendem Schema durchgeführt:

### Zeitpunkte der Bestimmung der Rotationsfrequenz



**Abbildung 4** zeigt das Schema des zeitlichen Ablaufs und die Zeitpunkte der Messung der Rotationsfrequenz der Versuche in Versuchsreihe 1

### 2.4.4. Bestimmung der Rotationsfrequenz

Die basale Rotationsfrequenz der Spheroiden wurde auf folgende Weise bestimmt (siehe Abbildung 4):

60, 40 und 20 Sekunden vor UV-Bestrahlung wurde jeweils die Zeit bestimmt, die das beobachtete Spheroid für drei Umdrehungen benötigte.

Zur Erfassung der stimulierten Rotationsfrequenz der Spheroiden wurde sofort nach UV-Bestrahlung, sowie innerhalb der folgenden Minute jeweils im Abstand von 10 Sekunden die Zeit gemessen, die das Spheroid für drei Umdrehungen benötigte.

Die Rotationsfrequenz wurde wie oben beschrieben berechnet und ausgewertet.

Um die Rotationsfrequenz der Nasalepithel-Spheroiden trotz individueller Unterschiede untereinander vergleichen zu können, wurden die ermittelten Ergebnisse jeweils auf den Wert der letzten Messung vor Stimulation normiert:

Messwert/ letzten Wert vor Stimulation durch ATP
--

### 2.5. Versuchsreihe 2: Versuche mit Nasalepithel-Spheroiden gesunder Probanden und Patienten mit allergischer Rhinitis nach Kultivierung mit oder ohne IL-13 und Stimulation durch freies ATP

In den folgenden Versuchen sollte untersucht werden, ob es in der Kultur von Nasalepithel-Spheroiden, ihrer basalen Rotationsfrequenz und der Stimulierbarkeit der Rotationsfrequenz durch freies ATP Unterschiede zwischen gesunden Probanden und Patienten mit allergischer Rhinitis gibt und ob Inkubation mit IL-13 einen Einfluss darauf hat.

Für diese Untersuchungen wurde ATP (Adenosine 5'-Triphosphate Disodium Salt #A6419, Sigma Aldrich) in einer bereits aktiven Form in die Versuchskammer gegeben.

### 2.5.1. Kultur der Nasalepithel-Spheroide mit IL-13

Für diese Versuchsreihe wurde respiratorisches Epithel bei gesunden Probanden und bei Patienten mit allergischer Rhinitis entnommen. In der Literatur wurden Untersuchungen mit IL-13 in Konzentrationen von 1 ng/l bis 100 ng/ml beschrieben (14, 15, 39, 55, 67, 68).

Darum wurde eine IL-13-Konzentration von 10 ng/ml gewählt.

Die Kultivierung von Nasalepithel-Spheroide mit IL-13 erfolgte analog zu der oben beschriebenen Kultur ohne IL-13:

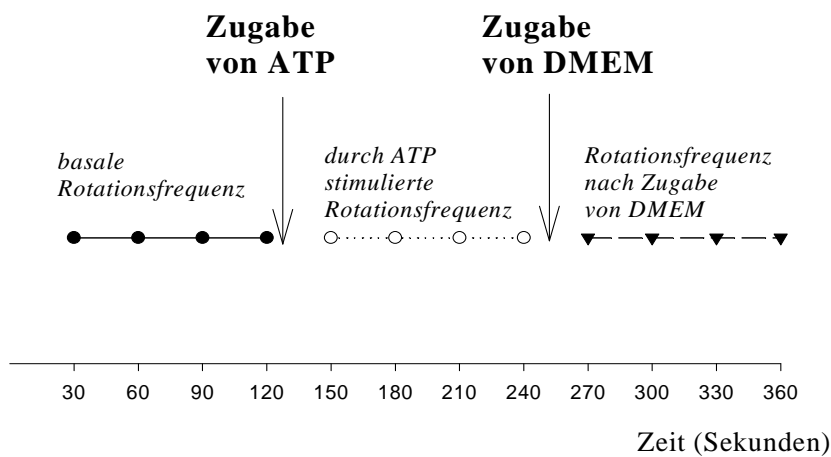
Die entnommene Schleimhaut eines Probanden wurde auf vier Wells einer agarbeschichteten Gewebekulturplatte aufgeteilt. In zwei der vier Wells wurden 100 µl AECBM mit IL-13 in einer Konzentration von 30 ng/ml (# 158854 Fa. ICN Biomedicals GmbH, Eschwege) gegeben, so dass nach Umverteilung die IL-13-Endkonzentration eines Wells mit 100 µl Medium und 200 µl Agar schließlich 10 ng/ml betrug. In die beiden übrigen Wells wurden je 100 µl AECBM ohne IL-13 gegeben. Die Auswahl der Wells, in die das IL-13 gegeben wurde, erfolgte nach Zufall.

Jeden zweiten Tag wurden 50 µl des Kulturmediums abpipettiert und durch frisches Medium ersetzt: In die Wells ohne IL-13 wurden je 50 µl AECBM gegeben. In die beiden Wells mit IL-13 wurden jeweils 50 µl AECBM mit IL-13 in einer Konzentration von 10 ng/ml pipettiert.

### 2.5.2. Versuchsprotokoll

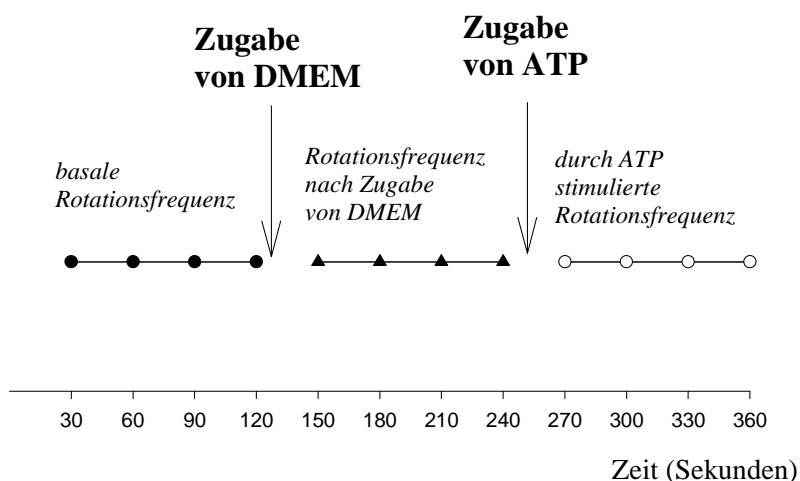
In dieser Versuchsreihe wurden die Nasalepithel-Spheroide mit einer ATP-Konzentration von 0,5 mmol/l stimuliert. Die Konzentration von 0,5 mmol/l ATP befindet sich im mittleren Bereich der Angaben aus der Literatur (37, 49, 50, 61, 65). Da hier ATP in einer bereits aktiven Form verwendet wurde, musste das ATP während des laufenden Versuches in die Versuchskammer pipettiert werden. Um den Effekt des ATP von den Auswirkungen der mechanischen Irritation durch das Pipettieren zu trennen, wurde als Kontrolle in jedem Versuch zusätzlich DMEM in die Kammer pipettiert und die Rotationsfrequenz entsprechend auch nach Zugabe des DMEM bestimmt. Daraus ergaben sich zwei Protokolle zur Versuchsdurchführung:

### Versuchsprotokoll A



**Abbildung 5** zeigt schematisch den Versuchsablauf nach Protokoll A und die Zeitpunkte der Messung der Rotationsfrequenz.

### Versuchsprotokoll B



**Abbildung 6** zeigt schematisch den Versuchsablauf nach Protokoll B und die Zeitpunkte der Messung der Rotationsfrequenz.

## 2. Materialien und Methoden

---

Welches der beiden Versuchsprotokolle zur Anwendung kam, wurde jeweils ausgelost. Für die Versuche wurden die Spherioide eines Wells in eine Petrischale mit DMEM versetzt und zusammen mit 150  $\mu$ l DMEM in die Versuchskammer pipettiert. Die Versuchsdurchführung verlief nach den bereits oben beschriebenen Schemata:

### **Protokoll A:**

- Versetzen der Spherioide im eigenen Schleim zusammen mit 150  $\mu$ l DMEM in die Versuchskammer
- Adaptationszeit von fünf Minuten
- Aufzeichnung der basalen Rotationsfrequenz über zwei Minuten
- Zugabe von 25  $\mu$ l einer 3,5 mmol/l ATP-Lösung, so dass in der Kammer eine ATP-Konzentration von 0,5 mmol/l erreicht wurde
- Aufzeichnung der stimulierten Rotationsfrequenz über zwei Minuten
- Zugabe von 25  $\mu$ l DMEM und Aufzeichnung der Rotationsfrequenz über zwei Minuten

### **Protokoll B:**

- Versetzen der Spherioide im eigenen Schleim zusammen mit 150  $\mu$ l DMEM in die Versuchskammer
- Adaptationszeit von fünf Minuten
- Aufzeichnung der basalen Rotationsfrequenz über zwei Minuten
- Zugabe von 25  $\mu$ l DMEM und Aufzeichnung der Rotationsfrequenz über zwei Minuten
- Zugabe von 25  $\mu$ l 4 mmol/l ATP-Lösung, so dass in der Kammer eine ATP-Konzentration 0,5 mmol/l erreicht wurde
- Aufzeichnung der stimulierten Rotationsfrequenz über zwei Minuten

Die benötigten Aliquots der DMEM-ATP-Lösung wurden für jeden Versuch frisch aufgetaut und im Wärmebad auf 35 °C erwärmt.

Aufgrund dieser Schemata und der Aufteilung der Spherioide nach Probanden und IL-13-Inkubation ergaben sich folgende Versuchsgruppen:

**Versuchsgruppe 1:** Spherioide gesunder Probanden, ohne IL-13 kultiviert, Protokoll A

**Versuchsgruppe 2:** Spherioide gesunder Probanden, ohne IL-13 kultiviert, Protokoll B

**Versuchsgruppe 3:** Spherioide gesunder Probanden, mit IL-13 kultiviert, Protokoll A

**Versuchsgruppe 4:** Spherioide gesunder Probanden, mit IL-13 kultiviert, Protokoll B

**Versuchsgruppe 5:** Spherioide allergischer Probanden, ohne IL-13 kultiviert, Protokoll A

**Versuchsgruppe 6:** Spherioide allergischer Probanden, ohne IL-13 kultiviert, Protokoll B

**Versuchsgruppe 7:** Spherioide allergischer Probanden, mit IL-13 kultiviert Protokoll A

**Versuchsgruppe 8:** Spherioide allergischer Probanden, mit IL-13 kultiviert, Protokoll B

### 2.5.3. Bestimmung der Rotationsfrequenz

Die Bestimmung der Rotationsfrequenz erfolgte analog zu den Versuchen mit NPE-caged-ATP.

In dieser Versuchsreihe wurden die Ergebnisse auf den letzten Messwert vor Zugabe von ATP bzw. DMEM normiert. Die Messungen erfolgten an festgesetzten Zeitpunkten während eines Versuchs.

**Protokoll A** (siehe Abbildung 5) :

- Vier Messungen der basalen Rotationsfrequenz jeweils im Abstand von 30 Sekunden
- Vier Messungen der stimulierten Rotationsfrequenz nach Zugabe von ATP jeweils im Abstand von 30 Sekunden
- Vier Messungen nach Zugabe von DMEM jeweils im Abstand von 30 Sekunden
- Normierung auf den letzten Messwert vor Zugabe von ATP

**Protokoll B** (siehe Abbildung 6):

- Vier Messungen der basalen Rotationsfrequenz jeweils im Abstand von 30 Sekunden
- Vier Messungen nach Zugabe von DMEM jeweils im Abstand von 30 Sekunden
- Vier Messungen der stimulierten Rotationsfrequenz nach Zugabe von ATP jeweils im Abstand von 30 Sekunden
- Normierung auf den letzten Messwert vor Zugabe von DMEM

### 2.6. Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mittels des Softwarepackets "Sigma Stat for Windows", Version 2,03, Copyright 1992-1997, SPSS Inc (USA).

Für den Vergleich zweier unabhängiger Variablen wurde der t-Test verwendet.

Für den Vergleich mehrerer abhängiger Variablen wurde der One Way Repeated Measures Analysis of Variance Test (One Way RM ANOVA) verwendet.

Waren die Ergebnisse nicht normal verteilt, wurde der Friedman Repeated Measures Analysis of Variance on Ranks Test (RM ANOVA on Ranks) angewendet. Für den Vergleich von Untergruppen wurde bei statistischer Signifikanz die Dunn`s Methode verwendet.



### 3. Ergebnisse

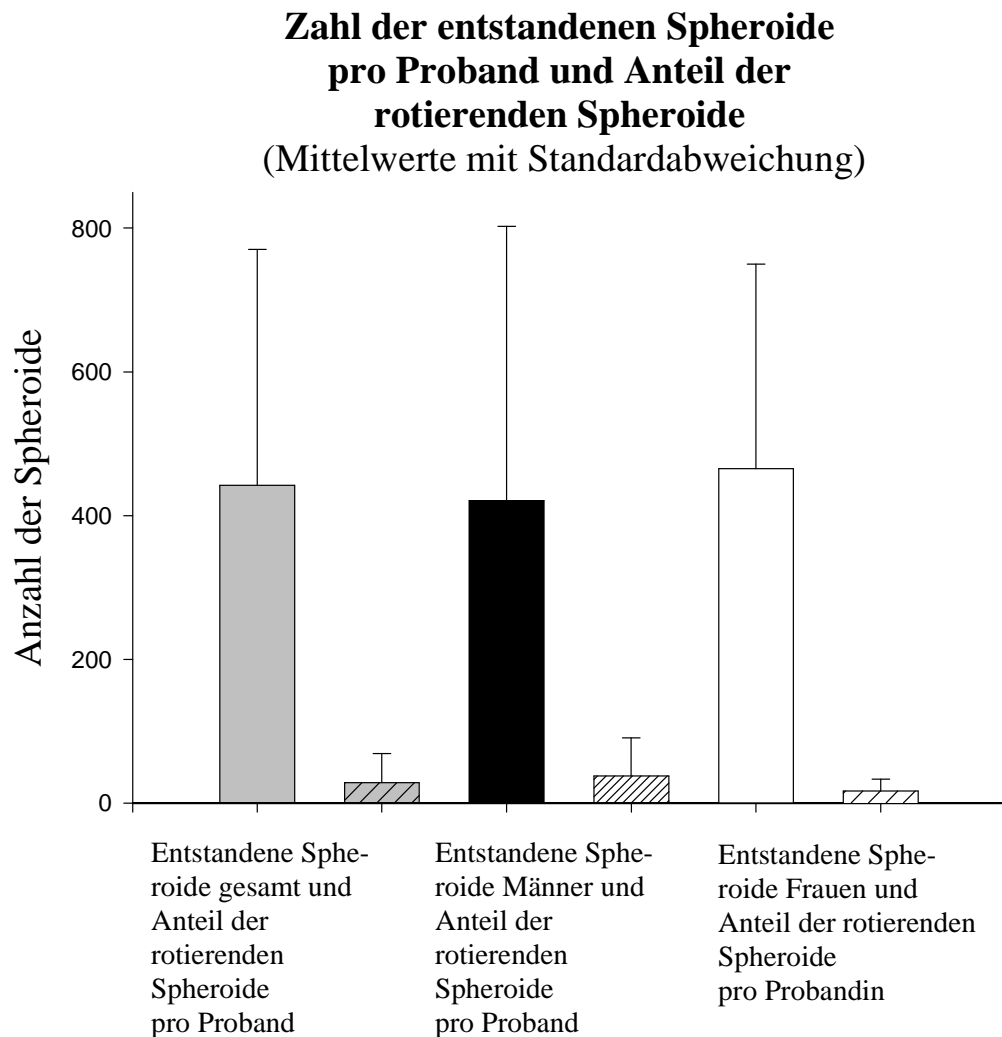
#### 3.1. Versuchsreihe 1: Versuche mit NPE-caged-ATP

In diesen Versuchen wurde die Wirkung von NPE-caged-ATP auf die mukoziliäre Funktion anhand von Nasalepithel-Spheroiden gesunder Probanden untersucht.

##### 3.1.1. Ergebnisse der Kultur der Nasalepithel-Spheroide

Grundlage für die Untersuchung der mukoziliären Funktion in dieser Arbeit waren rotierende Spheroide aus nasalem respiratorischem Epithel. Das respiratorische Epithel wurde bei den Probanden durch einen Bürstenabstrich aus dem unteren Nasengang entnommen und für zwei bis sieben Tage kultiviert. Im Folgenden soll zunächst dargestellt werden, wie hoch die Ausbeute an für Versuche geeigneten Nasalepithel-Spheroiden war.

Das nasale respiratorische Epithel wurde bei 18 Probanden, neun Frauen und neun Männern, im Alter von 22-53 Jahren, mittleres Alter  $29,3 \pm 9,7$  Jahre (Mittelwert mit Standardabweichung), entnommen und über eine Zeit von  $5,8 \pm 1,3$  Tage (Mittelwert mit Standardabweichung) kultiviert.



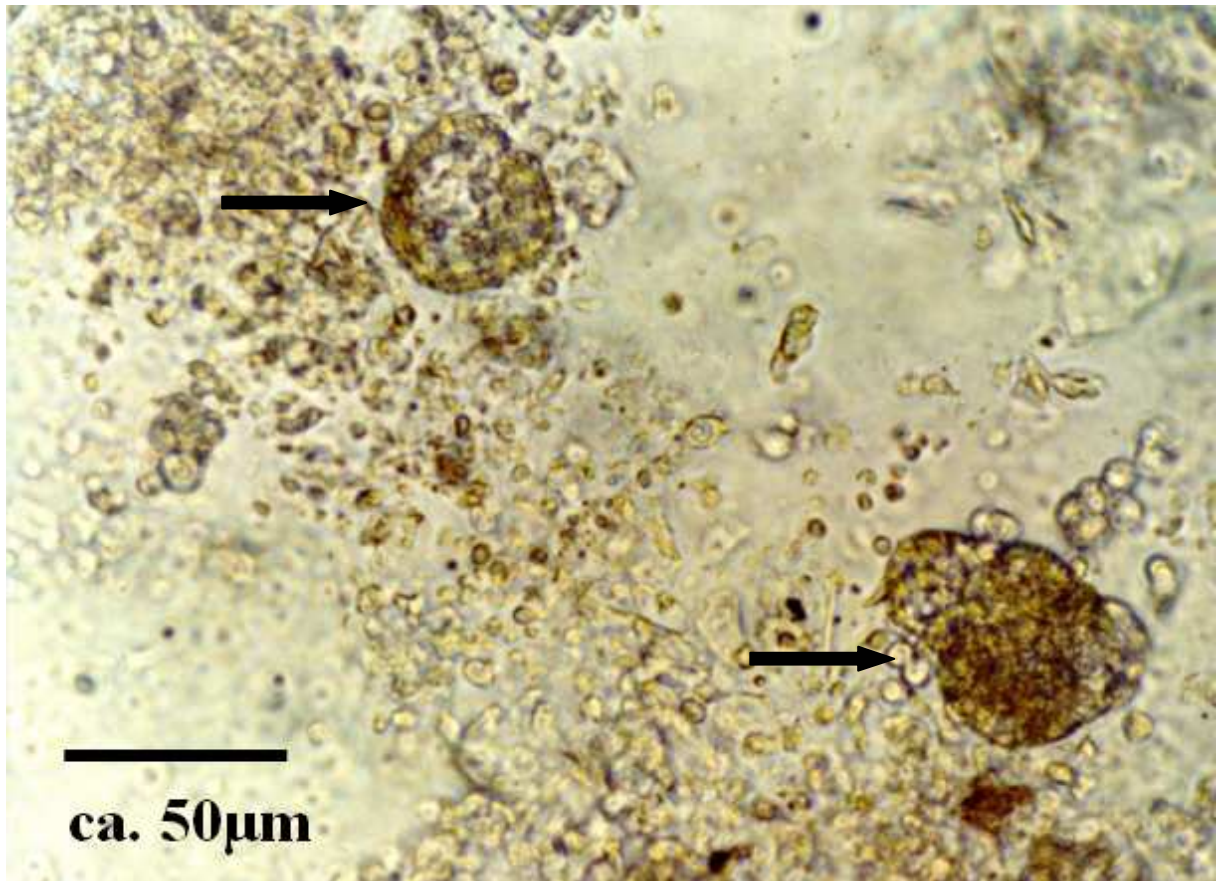
**Abbildung 7** zeigt die Anzahl der entstandenen Spheroide pro Proband und den Anteil der rotierenden Spheroide aller Probanden aufgeteilt nach Geschlecht als Mittelwert mit Standardabweichung.

Aus dem entnommenen Nasalepithel aller Probanden lagerten sich Spheroide zusammen. Bei 15 Probanden bildeten sich rotierende Spheroide, die für Versuche genutzt werden konnten. Die Anzahl der entstandenen Spheroide (folgende Angaben jeweils als Mittelwert mit Standardabweichung) betrug pro Proband  $442 \pm 328$ , davon rotierten  $28 \pm 40$  Spheroide. Zwischen der Anzahl der Spheroide von weiblichen ( $465 \pm 284$ ) und männlichen Probanden ( $421 \pm 381$ ) konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Auch für die Zahl der rotierenden Spheroide gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Männern

### 3. Ergebnisse

---

( $38 \pm 52$ ) und Frauen ( $16 \pm 16$ ) (t-Test  $P=0,965$ ). Die rotierenden Spheroide hatten einen Durchmesser von 49-216  $\mu\text{m}$ , im Mittel betrug der Durchmesser  $86,3 \pm 23,6 \mu\text{m}$ .

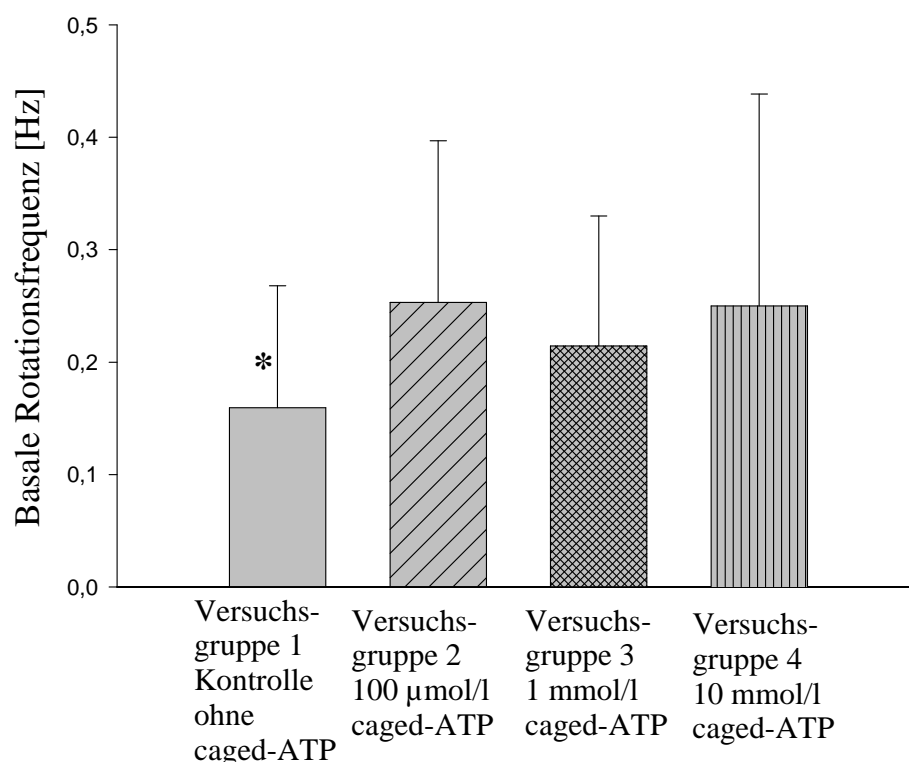


**Abbildung 8** zeigt Nasalepithel-Spheroide

#### 3.1.2. Vergleich der basalen Rotationsfrequenz der vier Versuchsgruppen

Um eine mögliche vorzeitige Aktivierung oder einen toxischen Effekt von NPE-caged-ATP aufzudecken, wurde die basale Rotationsfrequenz der Spherotide aus allen vier Versuchsgruppen untersucht. Dazu wurde die Rotationsfrequenz der Spherotide aus Versuchsgruppe 1 (Kontrollgruppe ohne NPE-caged-ATP), Versuchsgruppe 2 (NPE-caged-ATP in einer Konzentration von 100  $\mu\text{mol/l}$ ), Versuchsgruppe 3 (NPE-caged-ATP in einer Konzentration von 1  $\text{mmol/l}$ ) und Versuchsgruppe 4 (NPE-caged-ATP in einer Konzentration von 10  $\text{mmol/l}$ ) jeweils vor Bestrahlung mit UV-Licht miteinander verglichen.

#### Vergleich der basalen Rotationsfrequenz der Spherotide aus Versuchsreihe 1



**Abbildung 9** zeigt die basale Rotationsfrequenz der Spherotide aus Versuchsreihe 1 vor Aktivierung des ATP durch UV-Bestrahlung als Mittelwert und Standardabweichung zusammengefasst nach den vier Versuchsgruppen. \* Signifikanzen siehe Text

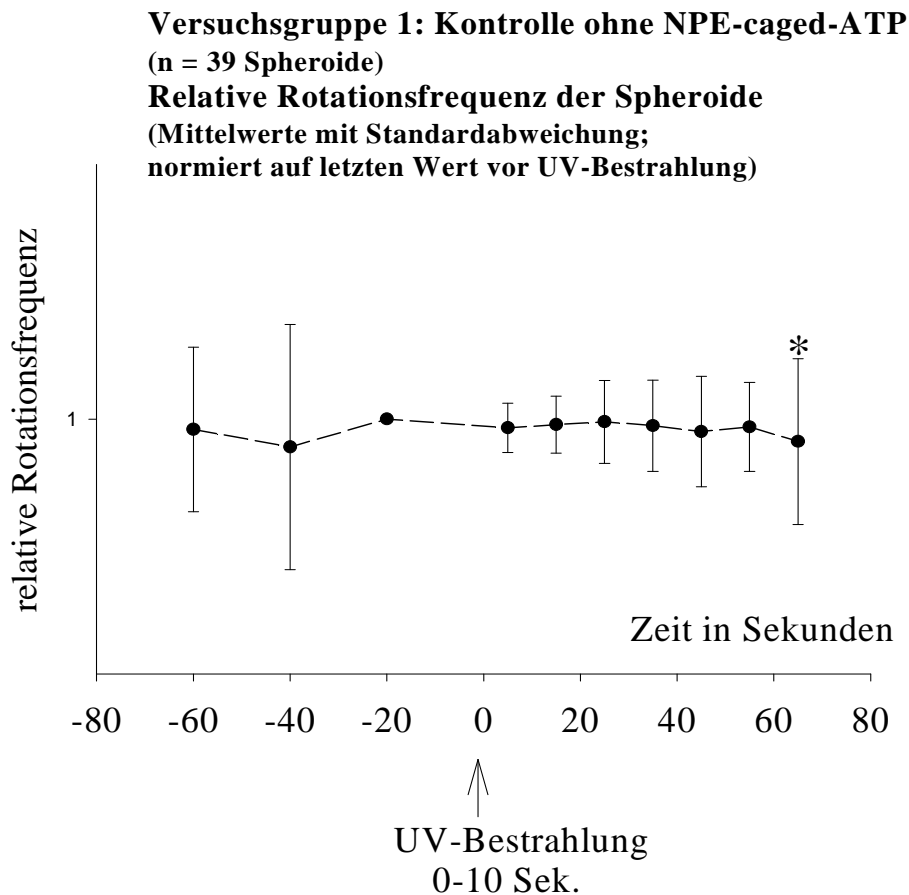
### 3. Ergebnisse

---

Im Vergleich der basalen Rotationsfrequenzen zeigte sich, dass die Spheroide der Kontrollgruppe (Versuchsgruppe 1) signifikant langsamer rotierten als Spheroide der Versuchsgruppen 2-4 mit NPE-caged-ATP in unterschiedlichen Konzentrationen (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks  $P = <0,001$ ). Zwischen den basalen Rotationsfrequenzen der Versuchsgruppen 2-4 zeigte sich kein signifikanter Unterschied (Dunn`s Method  $P <0,05$ ).

#### **3.1.3. Versuchsgruppe 1: Kontrollgruppe ohne NPE-caged-ATP**

In den Versuchen der Kontrollgruppe sollte untersucht werden, ob die Bestrahlung mit UV-Licht einen Einfluss auf die Rotationsfrequenz der Spheroide hat. Dafür wurden die Spheroide mit DMEM-Lösung, die kein NPE-caged-ATP enthielt, in die Versuchskammer gebracht und entsprechend des Versuchprotokolls 10 Sekunden lang mit UV-Licht bestrahlt.



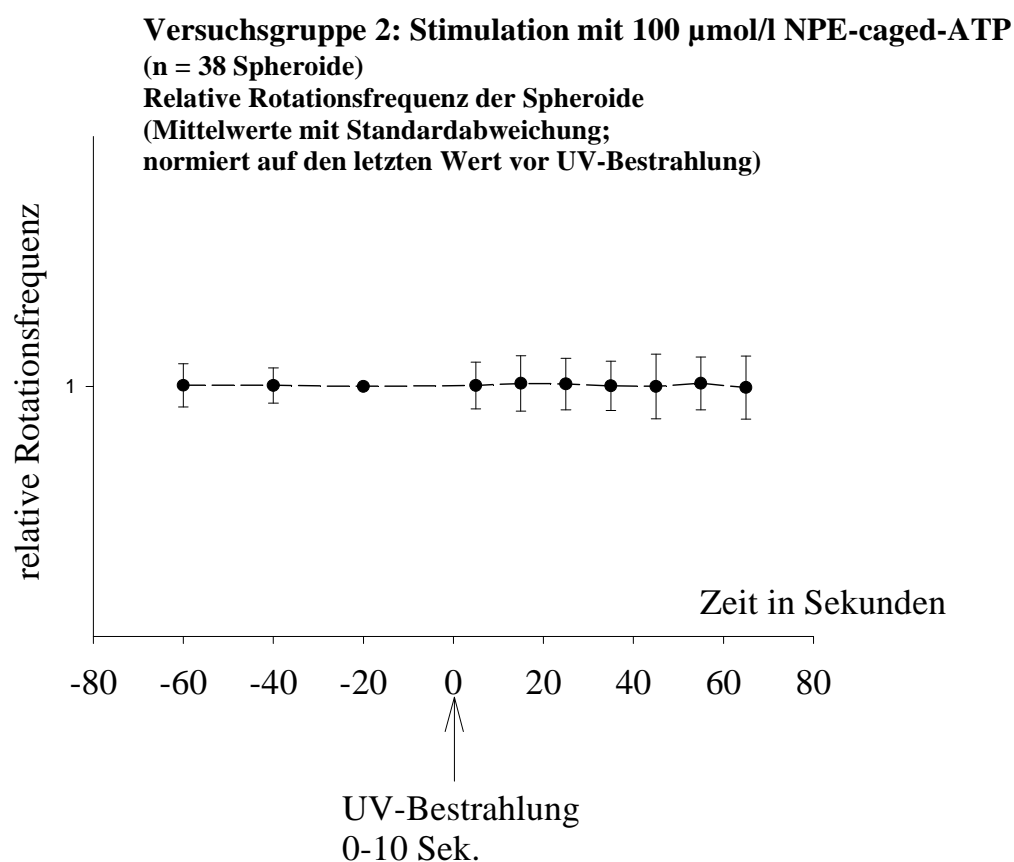
**Abbildung 10** zeigt die Rotationsfrequenz der Spheroide der Kontrollgruppe als Mittelwerte mit Standardabweichung vor und nach UV-Bestrahlung in Abhängigkeit von der Beobachtungszeit. Die Ergebnisse wurden auf den letzten Messwert vor UV-Bestrahlung (-20 Sekunden) normiert.

\* Signifikanzen siehe Text

In den Versuchen der Kontrollgruppe zeigten sich in der Rotationsfrequenz der Spheroide keine signifikanten Unterschiede, außer für die letzte Messungen 65 Sekunden nach UV-Bestrahlung: Hier rotierten die Spheroide signifikant langsamer als vor UV-Bestrahlung (RM ANOVA on Ranks  $p = 0,039$ ).

#### 3.1.4. Versuchsgruppe 2: Stimulation mit 100 $\mu\text{mol/l}$ NPE-caged-ATP

In den Versuchen der Gruppe 2 wurde getestet, ob sich die Rotationsfrequenz der Spherioide durch Stimulation mit NPE-caged-ATP einer Konzentration von 100  $\mu\text{mol/l}$  steigern lässt. Die Spherioide wurden in eine NPE-caged-ATP-Lösung von 100  $\mu\text{mol/l}$  gebracht. Nach Erfassung der basalen Rotationsfrequenz wurde das NPE-caged-ATP durch Bestrahlung mit UV-Licht über 10 Sekunden aktiviert.

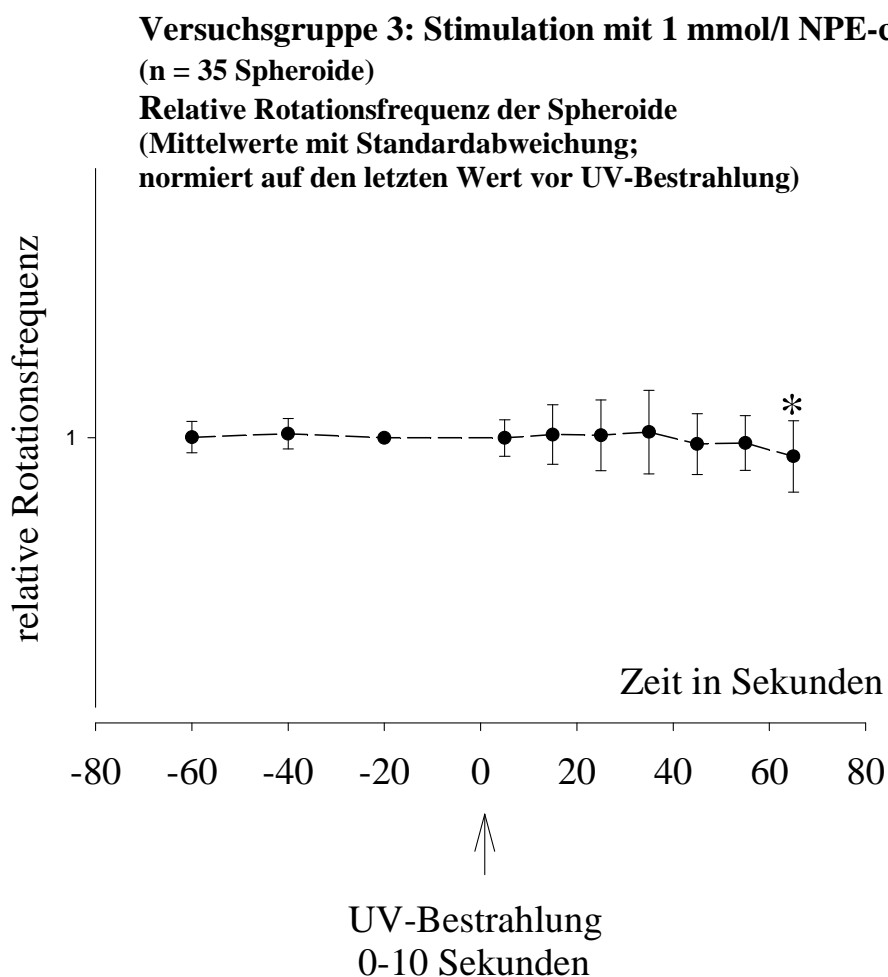


**Abbildung 11** zeigt die relative Rotationsfrequenz der Spherioide aus Versuchsgruppe 2 als Mittelwerte mit Standardabweichung vor und nach Aktivierung des NPE-caged-ATP in Abhängigkeit von der Zeit. Die Ergebnisse wurden auf den letzten Messwert vor UV-Bestrahlung (-20 Sekunden) normiert.

In diesen Versuchen kam es zu keiner statistisch signifikanten Änderung der Rotationsfrequenz der Spherioide nach Aktivierung von ATP (RM ANOVA on Ranks).

#### 3.1.5. Versuchsgruppe 3: Stimulation mit 1 mmol/l NPE-caged-ATP

In Versuchsgruppe 3 wurde untersucht, ob man die Rotationsfrequenz der Spheroiden mit NPE-caged-ATP einer Konzentration von 1 mmol/l erhöhen kann. Dafür wurden die Spheroiden in eine NPE-caged-ATP-Lösung mit einer Konzentration von 1 mmol/l gebracht. Durch UV-Bestrahlung über 10 Sekunden wurde das caged-ATP aktiviert.



**Abbildung 12** zeigt die relative Rotationsfrequenz der Spheroiden aus Versuchsgruppe 3 als Mittelwert und Standardabweichung vor und nach Aktivierung des NPE-caged-ATP in Abhängigkeit von der Zeit. Die Ergebnisse wurden auf den letzten Messwert vor UV-Bestrahlung (-20 Sekunden) normiert.  
\* Signifikanzen siehe Text



### 3. Ergebnisse

---

In Versuchsgruppe 3 ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Rotationsfrequenz der Spherioide unmittelbar nach Aktivierung von NPE-caged-ATP (One Way ANOVA ). Nur zum Zeitpunkt der 65-Sekunden-Messung rotierten die Spherioide signifikant langsamer als vor Aktivierung des caged-ATP (RM ANOVA on Ranks  $p < 0,001$ ).

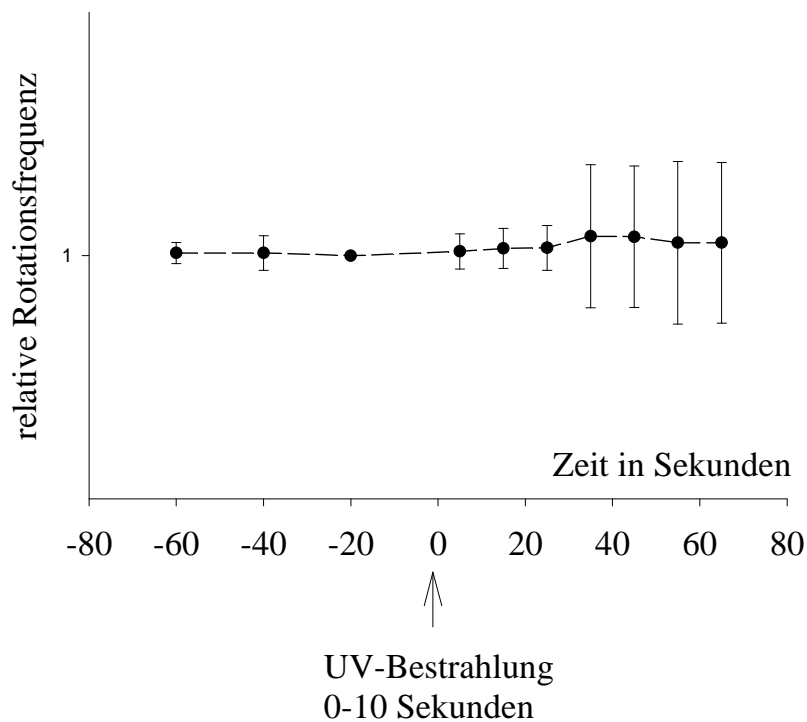
#### **3.1.6. Versuchsgruppe 4: Stimulation mit 10 mmol/l NPE-caged-ATP**

Hier sollte untersucht werden, ob eine NPE-caged-ATP-Lösung der Konzentration 10 mmol/l in der Lage ist, die Rotationsfrequenz der Spherioide zu erhöhen. Dafür wurden die Spherioide in eine NPE-caged-ATP-Lösung von 10 mmol/l gebracht und das caged-ATP wurde durch UV-Bestrahlung von 10 Sekunden aktiviert.

### 3. Ergebnisse

---

**Versuchsgruppe 4: Stimulation mit 10 mmol/l NPE-caged-ATP**  
(n = 25 Spheroide)  
**Relative Rotationsfrequenz der Spheroide**  
(Mittelwerte mit Standardabweichung;  
normiert auf den letzten Wert vor UV-Bestrahlung)



**Abbildung 13** zeigt die relative Rotationsfrequenz Spheroide aus Versuchsgruppe 4 als Mittelwerte mit Standardabweichung vor und nach Aktivierung des NPE-caged-ATP in Abhängigkeit von der Zeit. Die Ergebnisse wurden auf den letzten Messwert vor UV-Bestrahlung (-20 Sekunden) normiert.

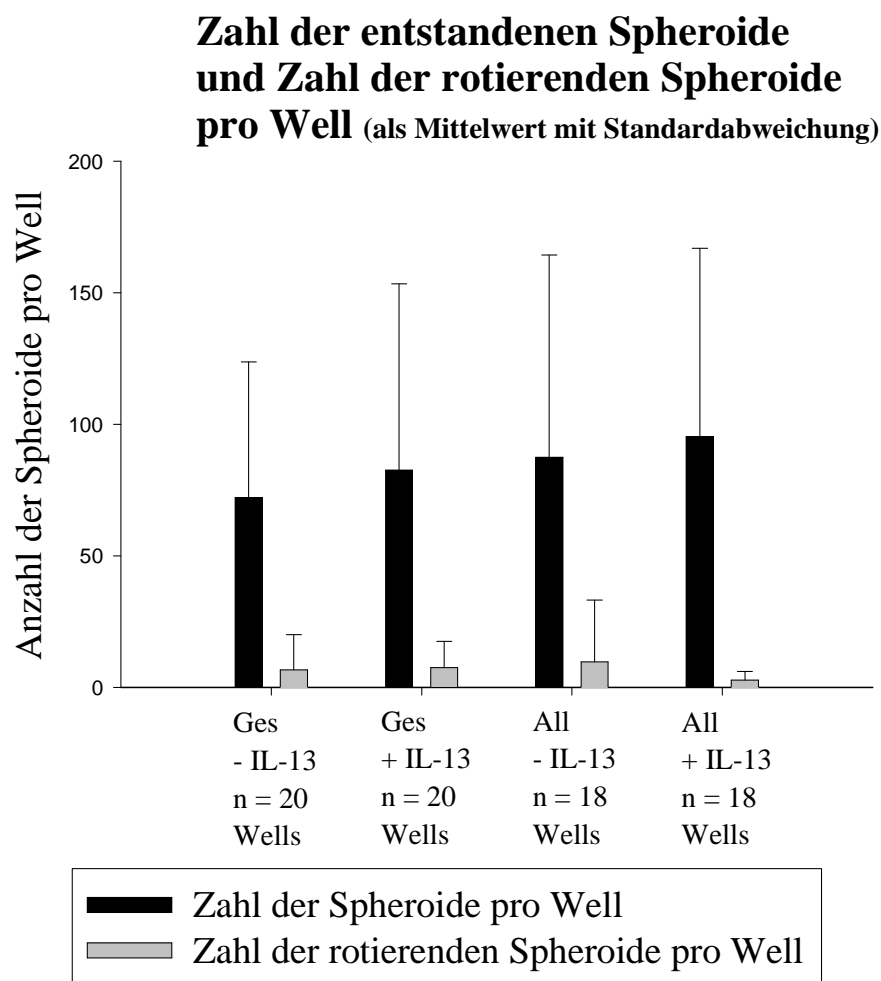
Auch in Versuchsgruppe 4 ergaben sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Rotationsfrequenz vor und nach Aktivierung des NPE-caged-ATP (RM ANOVA on Ranks).

#### **3.2. Versuchsreihe 2: Versuche mit Nasalepithel-Spheroïden gesunder Probanden und Patienten mit allergischer Rhinitis nach Kultivierung mit oder ohne IL-13 und Stimulation durch freies ATP**

In der zweiten Versuchsreihe wurde anhand von Nasalepithel-Spheroïden gesunder Probanden und allergischer Patienten, die jeweils mit und ohne IL-13 kultiviert worden waren, die Stimulierbarkeit der mukoziliären Funktion durch freies ATP und der Einfluss von IL-13 untersucht.

##### **3.2.1. Kultivierung von Nasalepithel-Spheroïden aus Schleimhautabstrichen gesunder Probanden und Patienten mit allergischer Rhinitis mit und ohne Zugabe von IL-13**

Zunächst sollte untersucht werden, ob sich in der Kultivierung von Nasalepithel-Spheroïden Unterschiede zwischen gesunden Probanden und Patienten mit allergischer Rhinitis feststellen lassen und ob IL-13 einen Einfluss auf die Kultivierung von Nasalepithel-Spheroïden hat. Kultiviert wurden die Bürstenabstriche von 19 Personen: Zehn gesunde Probanden und neun Patienten mit allergischer Rhinitis. Das Alter der Probanden lag zwischen 22 und 60 Jahren. Das entnommene Nasalepithel jedes Probanden und Patienten wurde nach Randomisierung zur Hälfte mit und zur Hälfte ohne IL-13 kultiviert. Dazu wurde das Nasalepithel jedes Probanden auf vier Wells einer Gewebekulturplatte aufgeteilt. Davon wurde in zwei Wells Medium und in die beiden anderen Wells Medium mit IL-13 gegeben. Deshalb kann in dieser Versuchsreihe die Zahl der entstandenen Spheroïde und der Anteil der rotierenden Spheroïde nur pro Well und nicht wie in Versuchsreihe 1 pro Proband angegeben werden. Es gehen also pro Proband jeweils zwei Wells in die Ergebnisse der Kultur ohne und je zwei Wells in die der Kultur mit IL-13 ein.



**Abbildung 14** zeigt die Zahl der entstandenen Spheroide und den Anteil der rotierenden Spheroide pro Well, aufgeteilt nach Diagnose und Inkubation mit IL-13 als Mittelwerte mit Standardabweichung.

Aus Material von gesunden Probanden, das ohne IL-13 kultiviert wurde, entwickelten sich (folgende Angaben jeweils als Mittelwerte mit Standardabweichung) nach  $4,7 \pm 0,8$  Tagen  $72,1 \pm 51,6$  Spheroide. Davon rotierten  $6,7 \pm 13,4$  Spheroide. Bei der Kultur von Nasenschleimhaut gesunder Probanden mit IL-13 in Kultur entstanden nach  $4,7 \pm 0,8$  Tagen  $82,6 \pm 70,7$  Spheroide, wovon  $7,6 \pm 9,9$  Spheroide rotierten. Bei allergischen Patienten bildeten sich in Kultur ohne IL-13 nach  $4,5 \pm 1$  Tagen  $87,4 \pm 76,9$  Spheroide. Von diesen rotierten  $9,8 \pm 23,5$  Spheroide.

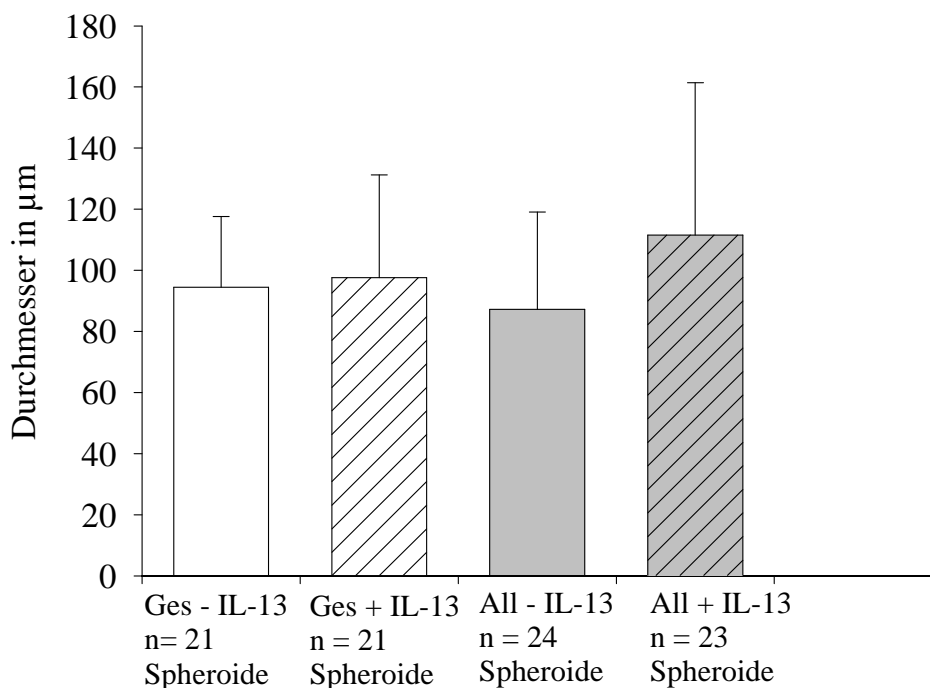
### 3. Ergebnisse

Nach Kultur von Nasalepithel allergischer Probanden mit IL-13 waren nach  $4,5 \pm 1$  Tagen  $95,3 \pm 71,7$  Spherioide entstanden. Es rotierten  $2,8 \pm 3,3$  Spherioide.

Hinsichtlich der Anzahl der entstandenen Spherioide und der rotierenden Spherioide zwischen den vier Versuchsgruppen ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede (ANOVA on Ranks).

Nur bei Spheroiden, die rotierten und mit denen Versuche durchgeführt wurden, konnte auch die Größe bestimmt werden. In die folgende Auswertung gingen also nicht die Werte aller entstanden Spherioide ein, sondern nur die der rotierenden Spherioide, mit denen Versuche durchgeführt wurden.

#### Durchmesser der rotierenden Spherioide (Mittelwerte mit Standardabweichung)



**Abbildung 15** zeigt die Durchmesser [µm] der rotierenden Spherioide aufgeteilt nach gesunden und allergischen Probanden und Inkubation mit IL-13 als Mittelwert mit Standardabweichung.

### 3. Ergebnisse

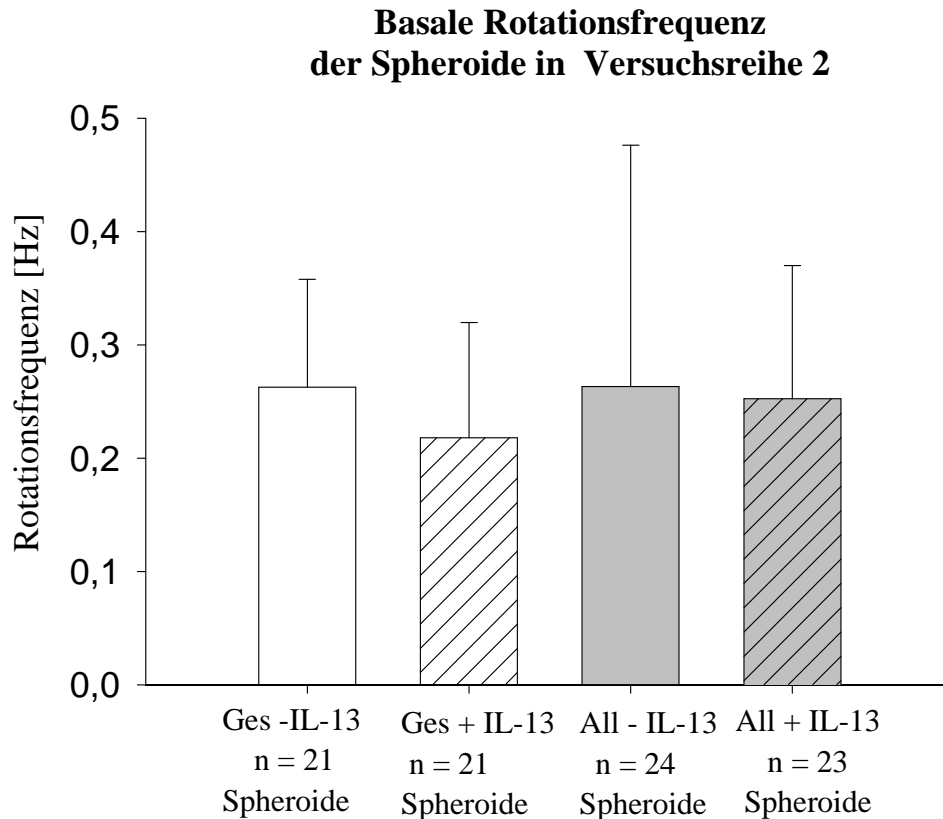
---

Die Spherioide gesunder Probanden, die ohne IL-13 kultiviert wurden, hatten einen Durchmesser von (folgende Angaben jeweils als Mittelwerte mit Standardabweichung)  $94,5 \mu\text{m} \pm 23,1 \mu\text{m}$ . Bei Inkubation mit IL-13 wurden die Spherioide gesunder Probanden  $97,6 \mu\text{m} \pm 33,7 \mu\text{m}$  groß. Spherioide allergischer Patienten ohne IL-13-Inkubation erreichten eine Größe von  $87,2 \mu\text{m} \pm 31,9 \mu\text{m}$ . Die Spherioide allergischer Patienten, die mit IL-13 kultiviert wurden, hatten einen Durchmesser von  $111,5 \mu\text{m} \pm 49,9 \mu\text{m}$ .

Die Spherioide der vier Versuchsgruppen waren gleich groß, die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen waren nicht signifikant (ANOVA on Ranks), Allergie oder Inkubation mit IL-13 hatten keinen Einfluss auf die Größe der Spherioide.

#### 3.2.2. Vergleich der basalen Rotationsfrequenz

In dieser Versuchsreihe sollte zunächst die basale Rotationsfrequenz der Spherioide von gesunden Probanden und Patienten mit allergischer Rhinitis verglichen und der Einfluss von IL-13 auf die basale Rotationsfrequenz untersucht werden. Dafür wurde bei Spheroiden gesunder Probanden und Patienten mit allergischer Rhinitis, die jeweils mit und ohne IL-13 inkubiert worden waren, die Rotationsfrequenz bestimmt: Die Rotation jedes Spheroids wurde für zwei Minuten aufgezeichnet. Anhand dieser Aufzeichnung wurde bei jedem einzelnen Spheroid im Abstand von dreißig Sekunden, also insgesamt vier mal, die Rotationsfrequenz ermittelt. Somit gingen pro Spheroid vier Messwerte in die Auswertung ein.



**Abbildung 16** zeigt die basale Rotationsfrequenz der Spherotide aus Versuchsreihe 2, aufgeteilt nach Diagnose und Inkubation mit IL-13 als Mittelwert mit Standardabweichung.

Zwischen den vier Versuchsgruppen ergab sich bei Bestimmung der basalen Rotationsfrequenz kein statistisch signifikanter Unterschied (ANOVA on Ranks).

#### **3.2.3. Ergebnisse der Versuche nach Protokoll A: Zugabe von ATP nach 120 Sekunden**

In den folgenden Versuchen wurde getestet, ob sich Unterschiede in der Stimulierbarkeit der Rotationsfrequenz der Spherotide gesunder und allergischer Probanden zeigen und wie sich die Inkubation mit IL-13 darauf auswirkt.

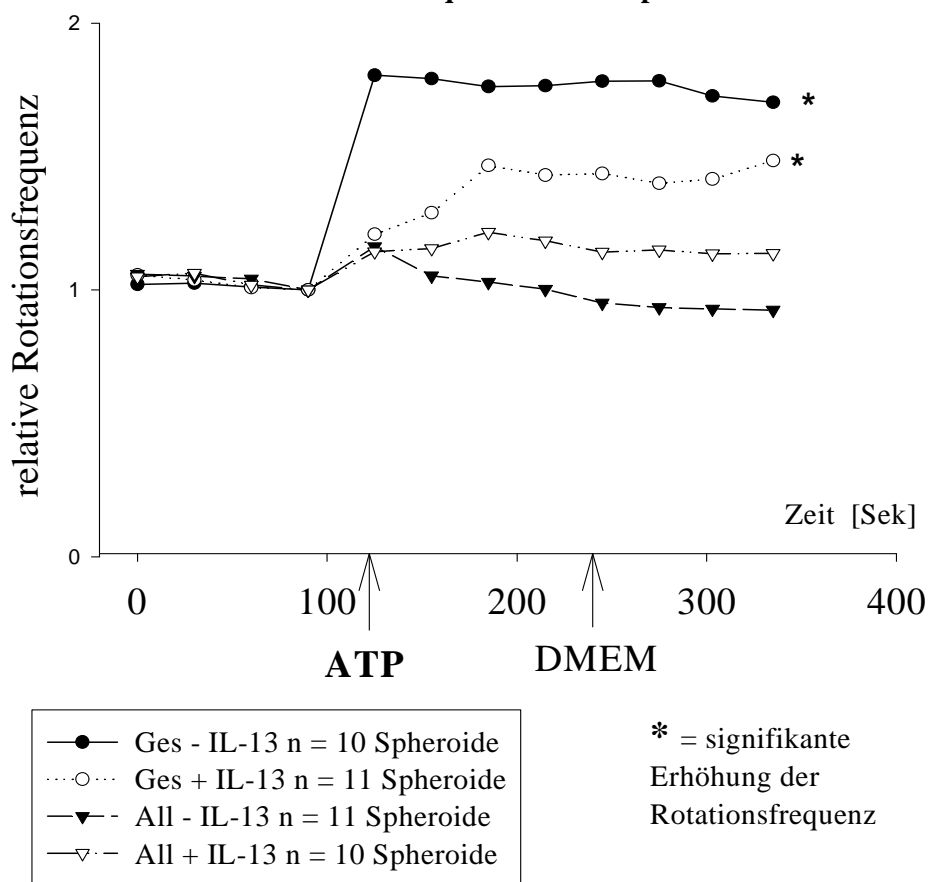
Zunächst wurde über zwei Minuten die basale Rotationsfrequenz bestimmt. Anschließend erfolgte die Zugabe von ATP. Nach weiteren zwei Minuten wurde als Kontrolle zusätzlich

### 3. Ergebnisse

DMEM in die Versuchskammer gegeben. Für die Auswertung wurde die Frequenz auf den letzten Wert vor Zugabe von ATP normiert.

#### Versuchsprotokoll A: Zugabe von ATP nach 120 Sekunden

Mittelwerte der relativen Rotationsfrequenz normiert auf die Rotationsfrequenz zum Zeitpunkt  $t = 90$  Sekunden



**Abbildung 17** zeigt die relative Rotationsfrequenz der Spherioide in Versuchen nach Protokoll A, dargestellt als Mittelwerte aufgetragen gegen die Zeit. Die Zugabe von ATP erfolgte nach 120 Sekunden, DMEM wurde nach 240 Sekunden in die Versuchskammer gegeben. Die Ergebnisse wurden auf den letzten Messwert vor Zugabe von ATP ( $t = 90$  Sekunden) normiert. \* Signifikanzen siehe Text



### 3. Ergebnisse

---

Spheroide von gesunden Probanden, die ohne IL-13 kultiviert worden waren, erhöhten nach Zugabe von ATP ihre Rotationsfrequenz signifikant. (One Way RM ANOVA  $p < 0,001$ ).

Auch Spheroide gesunder Probanden mit IL-13 in der Kultur rotierten nach Zugabe von ATP signifikant schneller (One Way RM ANOVA  $p < 0,001$ ).

Bei Spheroide allergischer Probanden, die ohne IL-13 kultiviert worden waren, kam es nach Zugabe von ATP zu keiner signifikanten Änderung der Rotationsfrequenz (One Way RM ANOVA).

Spheroide allergischer Probanden mit IL-13 in der Kultur veränderten nach Zugabe von ATP ihre Rotationsfrequenz nicht signifikant (One Way RM ANOVA).

Beim Vergleich der durch ATP stimulierten Rotationsfrequenz (Messpunkte 150, 180, 210 und 240 Sekunden) zwischen den vier Gruppen zeigten sich folgende Unterschiede (diese Ergebnisse sind in der obigen Abbildung nicht dargestellt):

Zwischen Spheroide gesunder Probanden mit und ohne IL-13-Inkubation ergab sich kein signifikanter Unterschied (Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks und Dunn`s Method  $p < 0,05$ ).

In der Gruppe der allergischen Probanden rotierten Spheroide, die mit IL-13 inkubiert worden waren, nach Gabe von ATP signifikant schneller, als Spheroide ohne IL-13-Inkubation (Kruskal-Wallis One Way ANOVA on ranks  $p < 0,001$  und Dunn`s Method  $p < 0,05$ ).

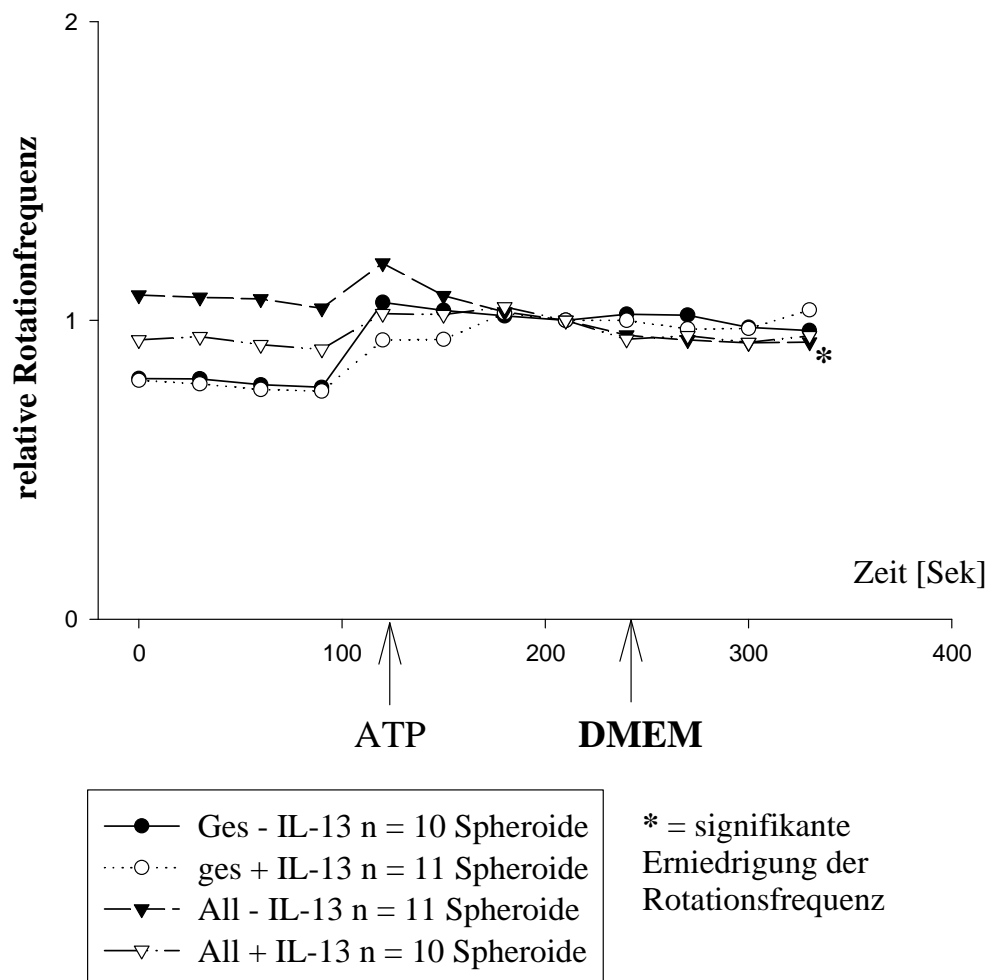
Spheroide gesunder Probanden ohne IL-13 in Kultur rotierten nach Stimulation durch ATP signifikant schneller als Spheroide allergischer Probanden mit und ohne IL-13 in Kultur (Kruskal-Wallis One Way ANOVA on ranks  $p < 0,001$  und Dunn`s Method  $p < 0,05$ ). Die Spheroide gesunder Probanden, die mit IL-13 kultiviert worden waren, rotierten nach Zugabe von ATP signifikant schneller als Spheroide allergischer Patienten ohne IL-13 in Kultur (Kruskal-Wallis One Way ANOVA on ranks  $p < 0,001$  und Dunn`s Method  $p < 0,05$ ).

Um eine mögliche Verfälschung der Ergebnisse durch das Pipettieren von ATP auszuschließen wurde zusätzlich DMEM als Kontrolle in die Versuchskammer gegeben:

#### Versuchsprotokoll A: DMEM nach 240 Sekunden

Mittelwerte der relativen Rotationsfrequenz

normiert auf die Rotationsfrequenz zum Zeitpunkt  $t = 210$  Sekunden



**Abbildung 18** zeigt die relative Rotationsfrequenz der Spheroide in Versuchen nach Protokoll A, dargestellt als Mittelwerte aufgetragen gegen die Zeit. Die Zugabe von ATP erfolgte nach 120 Sekunden, DMEM wurde nach 240 Sekunden in die Versuchskammer gegeben. Die Ergebnisse wurden auf den letzten Messwert vor Zugabe von DMEM ( $t = 210$  Sekunden) normiert.

Bei Spheroiden gesunder Probanden ohne IL-13 und mit IL-13 in der Kultur kam es nach Zugabe von DMEM zu keiner signifikanten Änderung der Rotationsfrequenz (Friedman RM ANOVA).

### 3. Ergebnisse

---

Nach Zugabe von DMEM fiel die Rotationsfrequenz der Spheroide von allergischen Patienten ohne IL-13 in Kultur signifikant ab (Friedman RM ANOVA on Ranks Dunn`s Method  $p < 0,001$ ).

Die Spheroide allergischer Probanden, die mit IL-13 kultiviert wurden, veränderten nach Zugabe von DMEM ihre Rotationsfrequenz nicht. (Friedman RM ANOVA on Ranks Dunn`s Method  $p = 0,016$ )

#### **3.2.4. Ergebnisse der Versuche nach Protokoll B: Zugabe von ATP nach 240 Sekunden**

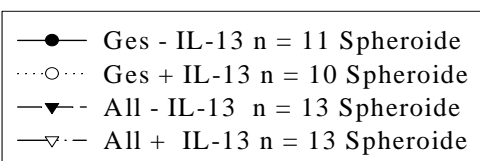
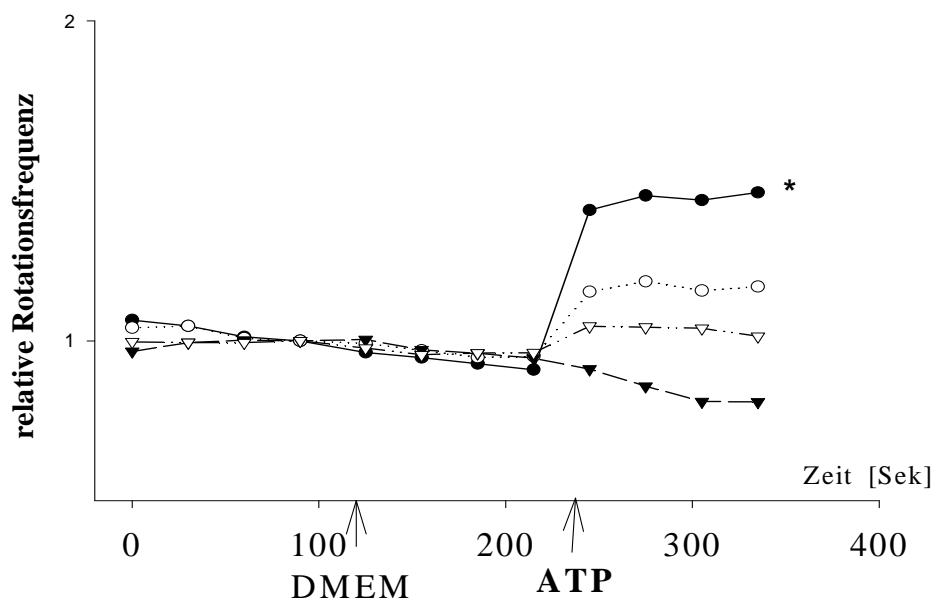
Hier sind die Ergebnisse der Versuche aus den vier Versuchsgruppen nach Protokoll B dargestellt: In Versuchen nach Protokoll B wurde nach 120 Sekunden DMEM und nach 240 Sekunden ATP in die Versuchskammer gegeben.

### 3. Ergebnisse

#### Versuchsprotokoll B: ATP nach 240 Sekunden

Mittelwerte der Rotationsfrequenz

normiert auf die Rotationsfrequenz zum Zeitpunkt  $t = 210$  Sekunden



\* = signifikante Erhöhung der Rotationsfrequenz

**Abbildung 19** zeigt die relative Rotationsfrequenz der Spheroide aus Versuchsprotokoll B dargestellt als Mittelwerte aufgetragen gegen die Zeit. Nach 120 Sekunden wurde DMEM in die Versuchskammer pipettiert. Die Zugabe von ATP erfolgte nach 240 Sekunden. Die Ergebnisse wurden auf den letzten Messwert vor Zugabe von ATP normiert ( $t = 210$  Sekunden). \* Signifikanzen siehe Text

### 3. Ergebnisse

---

Spheroide gesunder Probanden, die ohne IL-13 kultiviert worden waren, rotierten nach Zugabe von ATP signifikant schneller (One Way RM ANOVA  $p = 0,033$ ).

Bei Spheroiden gesunder Probanden mit IL-13 in Kultur kam es zu keinem signifikanten Anstieg der Rotationsfrequenz (One Way RM ANOVA).

Spheroide allergischer Probanden, ohne und mit IL-13 in Kultur zeigten nach Zugabe von ATP keinen Anstieg der Rotationsfrequenz (One Way RM ANOVA).

Im Vergleich der stimulierten Rotationsfrequenz (Messpunkte 270, 300, 330 und 360 Sekunden zusammengefasst) der einzelnen Versuchsgruppen ergaben sich folgende Unterschiede (diese Ergebnisse sind in der obigen Graphik nicht dargestellt):

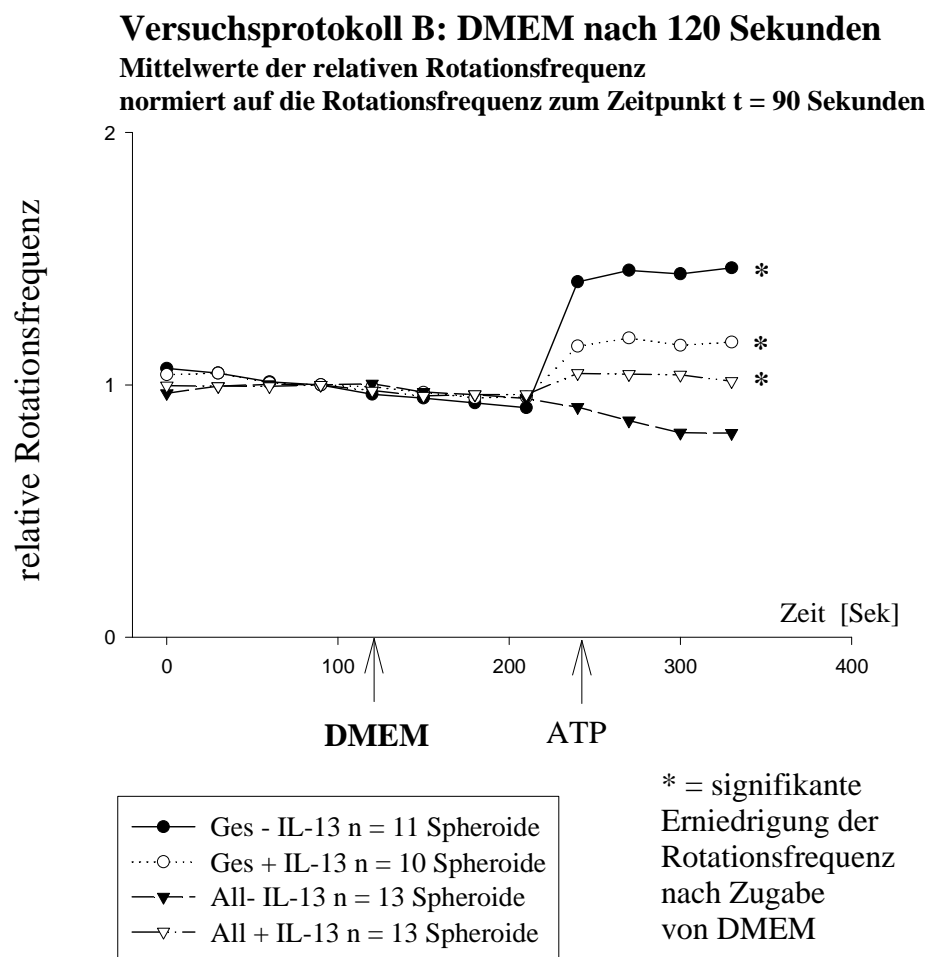
Spheroide gesunder Probanden ohne IL-13-Inkubation rotierten nach Stimulation durch ATP signifikant schneller als Spheroide von allergischen Probanden mit oder ohne IL-13 (One Way RM ANOVA und Dunn`s Method  $p < 0,001$ ). Die Spheroide gesunder Probanden mit IL-13-Inkubation rotierten nach ATP-Zugabe nicht signifikant schneller als Spheroide allergischer Probanden mit und ohne Kultivierung mit IL-13 (One Way RM ANOVA und Dunn`s Method).

Bei gesunden Probanden ergaben sich zwischen den mit und ohne IL-13 kultivierten Spheroiden keine signifikanten Unterschiede der Rotationsfrequenz nach Zugabe von ATP (One Way RM ANOVA und Dunn`s Method).

Auch zwischen den Spheroiden allergischer Patienten mit und ohne IL-13-Inkubation fand sich kein Unterschied in der Rotationsfrequenz nach Stimulation durch ATP (One Way RM ANOVA und Dunn`s Method).

### 3. Ergebnisse

Auch in Versuchen nach Protokoll B wurde DMEM als Kontrolle in die Versuchskammer gegeben und anschließend die Rotationsfrequenz der Spheroiden bestimmt:



**Abbildung 20** zeigt die relative Rotationsfrequenz der Spheroiden in Versuchsprotokoll B dargestellt als Mittelwerte aufgetragen gegen die Zeit. Nach 120 Sekunden wurde DMEM in die Kammer pipettiert. Die Zugabe von ATP erfolgte nach 240 Sekunden. Die Ergebnisse wurden auf den letzten Messwert vor Zugabe von DMEM (t = 90 Sekunden) normiert. \* Signifikanzen siehe Text

Nach Zugabe von DMEM sank die Rotationsfrequenz bei Spheroiden gesunder Probanden ohne IL-13 in Kultur signifikant ab (One Way RM ANOVA on Ranks und Dunn`s Method  $p = < 0,001$ ).

### 3. Ergebnisse

---

Auch Spherotide gesunder Probanden, die mit IL-13 kultiviert worden waren, rotierten nach Zugabe von ATP signifikant langsamer (One Way RM ANOVA on Ranks und Dunn`s Method  $p = < 0,001$ ).

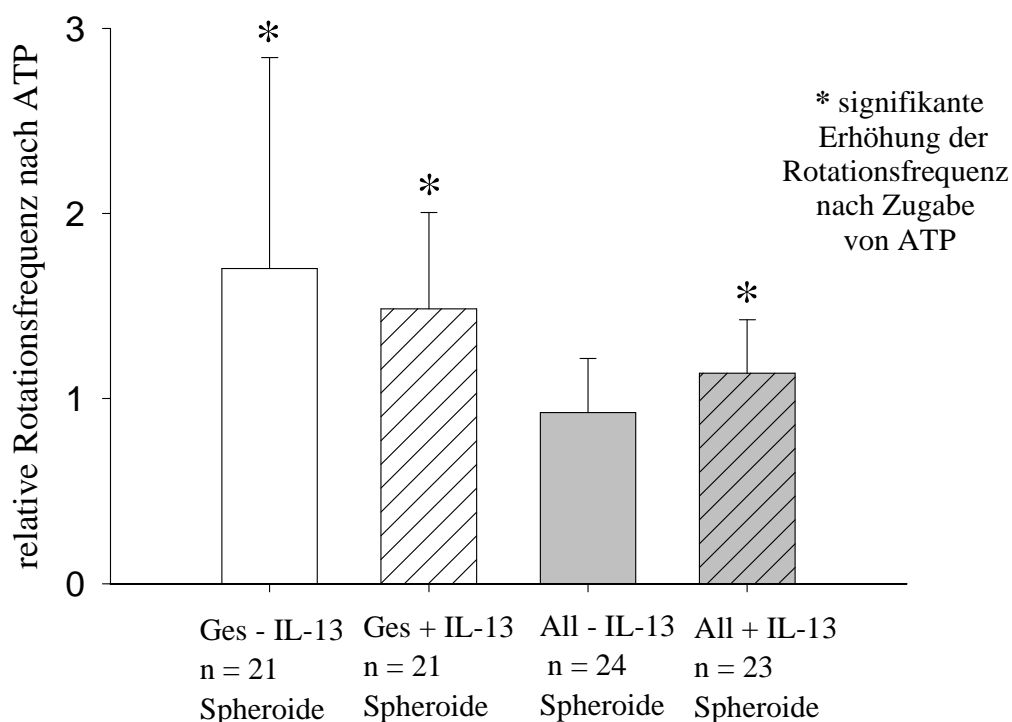
Bei Spherotiden allergischer Probanden ohne IL-13-Inkubation kam es nach Zugabe von DMEM zu keiner statistisch signifikanten Änderung der Rotationsfrequenz (Friedman One Way RM ANOVA on Ranks).

Spherotide allergischer Patienten, die mit IL-13 kultiviert worden waren rotierten nach Zugabe von DMEM signifikant langsamer (One Way RM ANOVA on Ranks und Dunn`s Method  $p = < 0,001$ ).

#### **3.2.5. Zusammenfassung der Ergebnisse aus Protokoll A und B**

Um die Reaktion auf Stimulation durch freies ATP aus beiden Versuchsprotokollen zwischen den vier Versuchsgruppen vergleichen zu können, wurden die Messergebnisse folgendermaßen ausgewertet: Entsprechend der vier Versuchsgruppen wurden alle Werte, die nach Zugabe von ATP bestimmt wurden, zusammengefasst. Aus Versuchen nach Protokoll A gingen somit jeweils acht Werte pro Spheroid und aus Versuchen nach Protokoll B jeweils vier Werte pro Spheroid in die Auswertung ein.

## Vergleich aller Messungen nach Stimulation durch ATP



**Abbildung 21** zeigt die Rotationsfrequenz der Spherioide nach Stimulation durch ATP als Mittelwert mit Standardabweichung aufgeteilt nach Diagnose und Inkubation mit IL-13. Es wurden alle Werte nach Zugabe von ATP berücksichtigt. Das heißt, pro Spheroid gingen vier bzw. acht Messwerte in die Auswertung ein. \* Signifikanzen siehe Text

Spherioide gesunder Probanden, die ohne IL-13 kultiviert worden waren, steigerten nach Gabe von ATP ihre Rotationsfrequenz signifikant. Sie rotierten nach Stimulation durch ATP signifikant schneller als Spherioide der anderen drei Versuchsgruppen (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks  $p < 0,001$  und Dunn`s Method  $P < 0,05$ ).

Die Spherioide von gesunden Probanden, die mit IL-13 kultiviert worden waren, erhöhten nach Stimulation durch ATP ihre Rotationsfrequenz signifikant und rotierten signifikant schneller als Spherioide von allergischen Patienten ohne IL-13 in Kultur (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks  $p < 0,001$  und Dunn`s Method  $P < 0,05$ ).

Bei Spheroiden allergischer Probanden, die ohne IL-13 kultiviert worden waren, kam es nach Zugabe von ATP zu keiner signifikanten Änderung der Rotationsfrequenz. Sie rotierten



### 3. Ergebnisse

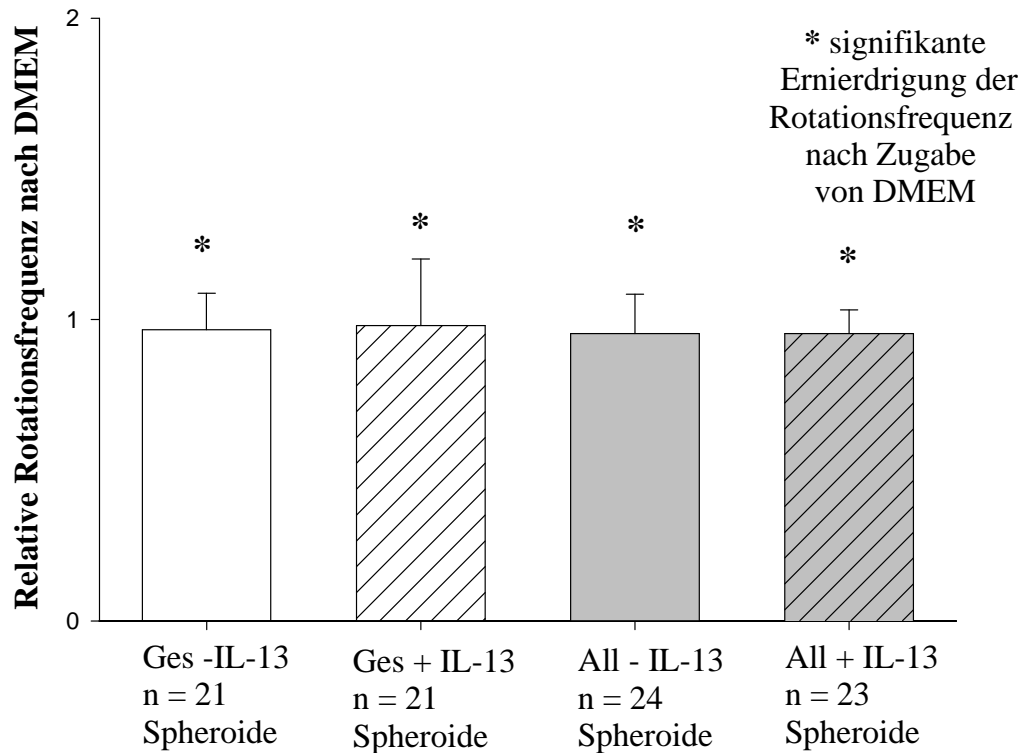
---

signifikant langsamer als die Spheroiden der anderen drei Versuchsgruppen. (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks  $p < 0,001$  und Dunn's Method  $P < 0,05$ ).

Dagegen stieg die Rotationsfrequenz von Spheroiden allergischer Patienten, die mit IL-13 kultiviert worden waren, nach Stimulation mit ATP signifikant an. Die Spheroiden rotierten signifikant schneller als Spheroiden allergischer Patienten ohne IL-13-Inkubation und signifikant langsamer als Spheroiden gesunder Probanden ohne IL-13 in der Kultur (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks  $p < 0,001$  und Dunn's Method  $P < 0,05$ ). Zwischen Spheroiden gesunder Probanden mit IL-13 in Kultur und Spheroiden allergischer Patienten mit IL-13 in Kultur ergab sich kein signifikanter Unterschied in der stimulierten Rotationsfrequenz (Kruskal Wallis One Way ANOVA on Ranks  $p < 0,001$  und Dunn's Method  $P < 0,05$ ).

Analog zur Auswertung der Reaktion auf Gabe von ATP wurden auch alle Werte, die in Versuchen nach Protokoll A und B nach Zugabe von DMEM gemessen wurden, entsprechend der vier Versuchsgruppen zusammengefasst. Das bedeutet, dass in Versuchen nach Protokoll A pro Spheroid vier Messwerte nach Gabe von DMEM in die Auswertung eingehen. Aus Versuchen nach Protokoll B gingen pro Spheroid ebenfalls vier Werte nach Gabe von DMEM und vor Stimulation durch ATP in diese Auswertung ein.

#### Vergleich aller Messungen nach Zugabe von DMEM



**Abbildung 22** zeigt die Rotationsfrequenz der Spheroide nach Gabe von DMEM als Mittelwert mit Standardabweichung aufgeteilt nach Diagnose und Inkubation mit IL-13. Es wurden alle Werte nach Zugabe von DMEM ohne Stimulation mit ATP berücksichtigt. Das heißt, pro Spheroide gingen vier Messwerte in die Auswertung ein. \* Signifikanzen siehe Text

Nach Zugabe von DMEM kam es bei Spheroiden aller vier Versuchsgruppen zu einem signifikantem Abfall der Rotationsfrequenz (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks  $P = <0.001$ ).

Im Vergleich der Rotationsfrequenzen der vier Versuchsgruppen nach Gabe von DMEM ergab sich kein signifikanter Unterschied (Dunn`s Method  $P < 0,05$ ).

## 4. Diskussion

### 4.1. Diskussion der Methoden und Materialien

#### 4.1.1. Spherotide

Bei Spherotiden handelt es sich um eine nicht adh rente, dreidimensionale Form der Kultivierung respiratorischer Epithelien. Anhand von Spherotiden aus respiratorischem Epithel wurden bereits verschiedene Untersuchungen durchgeführt:

Pedersen untersuchte anhand von Spherotiden aus respiratorischem Epithel den Ionentransport und die Flüssigkeitsabsorption in respiratorischem Epithel (54). Bridges beschrieb die Kultur von Nasalepithel-Spherotiden und regte an, mit Spherotiden auch Untersuchungen zur ziliären Schlagfrequenz vorzunehmen (5). Laoukili schließlich kultivierte Spherotide aus gelösten Zellen einer Monolayer-Kultur zur Untersuchung der Ziliogenese (39).

Bridges und Jorisson beschrieben in ihren Arbeiten (5, 64, 68) rotierende Spherotide aus respiratorischem Epithel der Nase. Hinsichtlich der Zelltypen und Zilienfunktion gibt es keine großen Unterschiede zwischen Zellen des respiratorischen Epithels aus der Nase und den Bronchien (11). Mit der Kultivierung von Nasalepithel-Spherotiden wurde nun die Spherotid-Methode, für die in unserer Arbeitsgruppe bisher Bronchialepithel verwendet wurde, modifiziert. Die Verwendung von Nasalepithel weist gegenüber der Verwendung von Bronchialepithel große Vorteile auf:

Nasalepithel kann durch einen Bürstenabstrich aus der Nase gewonnen werden, wohingegen Bronchialepithel nur während einer Bronchoskopie entnommen werden kann. Aus diesem Grund stehen für Untersuchungen mit Bronchialepithel auch nur Patienten, die sich einer Bronchoskopie unterziehen müssen, als Probanden zur Verfügung. Die Entnahme von Nasalepithel hingegen kann wenig aufwendig und ohne große Risiken auch bei gesunden Probanden erfolgen. Die Ein- und Ausschlusskriterien für Spender können dabei genauer definiert und es können sehr viele Probanden- und Patientengruppen untersucht werden.

### 4.1.2. Kultur von Nasalepithel-Spheroïden

Die Bürstenabstriche vom unteren Nasengang wurden nach Entnahme gewaschen und auf agarbeschichteten Gewebekulturplatten mit AECBM kultiviert. Die Agarbeschichtung und das Medium verhinderten eine Adhäsion der Zellen auf der Gewebekulturplatte, so dass sich die Epithelzellen, um ihre Polarität beizubehalten, zu Spheroïden zusammenlagerten.

AECBM war bereits für andere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe mit Erfolg verwendet worden. Da AECBM kein Serum enthält, Bridges aber in seinen Versuchen die Spheroïde in Medium, das Serum enthielt, kultivierte, wurden dem AECBM 5% NCS hinzugegeben (5). Zur Vermeidung von Verunreinigungen der Kulturen wurden dem Medium Antibiotika und Antimykotika zugegeben. Das Medium wurde jeden zweiten Tag gewechselt, um eine Beeinflussung durch Nährstoffmangel, Veränderung von Osmolarität und pH-Wert zu vermeiden (70).

### 4.1.3. Versuchsaufbau und Bestimmung der Rotationsfrequenz der Nasalepithel-Spheroïde

Bei der Anordnung der Geräte zur Versuchsdurchführung wurde besonderer Wert darauf gelegt, die Rotation der Spheroïde nicht von außen zu beeinflussen:

Watt schreibt, dass respiratorisches Epithel bei mechanischer Irritation ATP sezerniert und so seine mukoziliäre Funktion parakrin stimuliert (23, 76). Um Erschütterungen, die möglicherweise eine ATP-Sekretion auslösen könnten, zu vermeiden, standen die Geräte für die Versuche auf einer festen Arbeitsfläche.

Frühere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass auch Temperaturschwankungen einen Einfluss auf die ziliäre Schlagfrequenz haben. Der optimale Bereich liegt zwischen 35-37 °C (33, 34). Aus diesem Grund wurde die Temperatur in der Versuchskammer konstant auf  $35 \pm 0,5$  °C gehalten.

Die Versuchskammer wurde außerdem mit einem Deckgläschen verschlossen, um die Verdunstung von Medium und somit eine Änderung der Osmolarität und der Konzentration der Testsubstanzen zu verhindern (70). Das Mikroskop und die Videokamera waren so angebracht, dass die Videoaufzeichnung auch während des Einbringens von ATP oder

Bestrahlung mit UV-Licht nicht unterbrochen werden musste. Damit der Inhalt der Versuchskammer besser mit UV-Licht bestrahlt werden konnte, war die Wand der Versuchskammer auf einer Seite leicht abgesenkt.

Während der Versuche mit NPE-caged-ATP wurde die Versuchskammer von oben und unten mit Filtern vor einfallendem UV-Licht geschützt. Zusätzlich wurde der Raum, in dem die Versuche durchgeführt wurden, abgedunkelt.

Zur Bestimmung der Rotationsfrequenz der Spheroide wurde anhand der Videoaufzeichnung der Versuche die Zeit bestimmt, die ein Spheroid für drei Umdrehungen benötigte. Aufgrund der asymmetrischen Form der Spheroide konnte man Beginn und Ende einer Umdrehung genau erkennen. Durch langsames Vorspulen des Videos und anhand der im Video mitlaufenden Uhr konnte die für drei Umdrehungen benötigte Zeit auf 0,01 Sekunde genau ermittelt werden. Es wurden jeweils drei Umdrehungen ausgezählt und daraus der Mittelwert gebildet, um die Messung nicht durch möglicherweise kurzzeitig auftretende Schwankungen der mukoziliären Funktion zu verfälschen.

Im Vergleich zu anderen Methoden zur Untersuchung der ziliären Schlagfrequenz oder der mukoziliären Funktion, wie etwa der Photoverstärkermethode oder der Highspeed-Video-Aufzeichnung, stellt der einfache Versuchsaufbau und -ablauf einen Vorteil der Spheroid-Methode dar. Anhand der Rotationsfrequenz der Nasalepithel-Spheroide können Aussagen über die mukoziliäre Funktion gemacht werden. Bei der Photoverstärkermethode wird über die Änderungen der Intensität eines Lichtstrahls, der durch die zu untersuchende Probe strahlt, die Schlagfrequenz einzelner fokussierter Zilien ermittelt. So kann die Schlagfrequenz einzelner Zilien bestimmt werden. Auch rasche kurzzeitige Änderungen der ziliären Schlagfrequenz könne mit dieser Methode erfasst werden (8). Bei der Highspeed-Video-Aufzeichnung wird anhand einer Videoaufzeichnung die ziliäre Schlagfrequenz bestimmt. Anhand dieser Videoaufzeichnung kann zusätzlich der genaue Ablauf des Schlages einzelner Zilien untersucht werden (81). Allerdings wird bei der Photoverstärker-Methode und der High-Speed-Video-Aufzeichnung auch nur die Schlagfrequenz weniger Zilien oder kleiner Areale von respiratorischem Epithel (8, 81) bestimmt. Über die Effektivität des Zilienschlages, die rheologischen Eigenschaften des Mukus und die Interaktion der Zilien mit dem Mukus kann hierbei keine Aussage gemacht werden. In vivo sind jedoch neben der ziliären Schlagfrequenz weitere Faktoren für die mukoziliäre Funktion von Bedeutung: Es

sind viele Zilien in das System der mukoziliären Funktion eingebunden und auch die Orientierung der Zilien, sowie die Übertragung von Signalen, die Koordination des Zilienschlages und die Zusammensetzung des Mukus spielen eine wichtige Rolle (9, 33, 57). Mit der Spheroid-Methode können Aussagen über die Effektivität des Zilienschlages größerer Zellverbände und indirekt auch über die Schlagfrequenz der Zilien gemacht werden: Erhöht ein Spheroid seine Rotationsfrequenz kurzfristig, so wird dies wahrscheinlich hauptsächlich über eine Erhöhung der ziliären Schlagfrequenz geschehen.

Es ist zu beachten, dass die Ergebnisse der vorliegenden Versuche nicht repräsentativ sind für die ziliäre Schlagfrequenz in den gesamten Atemwegen eines Probanden, denn durch den Bürstenabstrich werden nur einige wenige Zellen aus der Nase entnommen. Devalia berichtet zwar, dass die Zilien der Nase und der Bronchien ähnlich schnell schlagen (11), Rutland aber schreibt, dass die ziliäre Schlagfrequenz in den zentralen Abschnitten der Atemwege höher ist als in den kleinen Bronchien (59). Vergleiche mit Spheroide aus Bronchialepithel wurden in dieser Arbeit nicht durchgeführt.

Zusätzlich zum Zilienschlag wird bei der Spheroid-Methode auch der Mukus in die Untersuchung mit einbezogen. Die Spheroide rotieren im eigenen Mukus und die Zilien sind von ihrer eigenen periziliären Flüssigkeit umgeben. Eine Veränderung dieser beiden Komponenten der mukoziliären Funktion wirkt sich sehr wahrscheinlich auch auf die Rotationsfrequenz der Spheroide aus. Es ist allerdings nicht klar, zu welchem Anteil der Mukus in den Spheroidkulturen weiter gebildet wird. Jorissen schreibt, dass in Kultur kaum noch Schleim sezerniert wird (29, 31). Dagegen berichtet Frigas, dass in Bronchusringkulturen Schleim gebildet wird (21). Des Weiteren könnten die Waschvorgänge, das Medium und der Mediumwechsel einen Einfluss auf die Zusammensetzung des Schleims gehabt haben. Die Zusammensetzung und Menge des Mukus wurde in dieser Arbeit nicht analysiert.

Beim Saccharin-Test wird die mukoziliäre Funktion in ihrer Gesamtheit, also das Schlagen der Zilien vieler Zellen, die Koordination des Zilienschlages und der Schleim *in vivo* untersucht. Dazu wird die Zeit gemessen, nach der ein Proband, bei dem ein Saccharin-Stückchen auf der Concha nasalis inferior platziert wurde, den Geschmack des Saccharins wahrnimmt (24). In dieses *In-Vivo*-Verfahren gehen allerdings Störfaktoren wie der

Geschmackssinn, Medikation und Motivation der Probanden mit ein. Das Versuchsergebnis hängt von der Mitarbeit der Probanden ab und in den Untersuchungen von Ho konnten nur 40 % der Probanden den Saccharintest überhaupt durchführen (24). Diese Nachteile entfallen bei einer In-Vitro-Untersuchung wie etwa der Spheroid-Methode.

Bei der Rhinoszintigraphie wird die mukoziliäre Funktion in vivo objektiv gemessen (64): Hier wird bei Probanden Tc-99m Albumin in den unteren Nasengang getropft und nach Aufzeichnung über eine Gammakamera die Transportgeschwindigkeit errechnet. Allerdings werden bei diesem Verfahren die Probanden einer Strahlung ausgesetzt und die Methodik ist sehr aufwendig.

Wie in unserer Arbeitsgruppe gezeigt wurde, stellt die Spheroid-Methode ein geeignetes Verfahren dar, um mit geringem Aufwand und einfachen Mitteln die mukoziliäre Funktion in ihrer Gesamtheit und den Einfluss verschiedener Substanzen auf die mukoziliäre Funktion in vitro zu untersuchen. Durch die Verwendung von Nasalepithel kann Material von verschiedenen Patientengruppen und gesunden Probanden untersucht werden.

### 4.1.4. Versuchsstoffe

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob sich durch Zugabe von ATP die Rotationsfrequenz der Nasalepithel-Spheroiden von Gesunden und Allergikern stimulieren lässt und ob IL-13 einen Einfluss auf die Kultur und die Rotation von Nasalepithel-Spheroiden hat.

#### 4.1.4.1. ATP

ATP gilt als potenter Stimulus zur Steigerung der ziliären Schlagfrequenz (41, 49, 61, 69, 74). Aus diesem Grund wurde ATP für die Untersuchung der Stimulierbarkeit der Rotationsfrequenz der Spheroiden ausgewählt.

### 4.1.4.1.1. NPE-caged-ATP

In der ersten Versuchsreihe sollte untersucht werden, ob die Rotationsfrequenz der Nasalepithel-Spheroide von gesunden Probanden durch NPE-caged-ATP gesteigert werden kann.

Bei NPE-caged-ATP handelt es sich um eine Substanz, deren biologische Wirksamkeit durch Bindung an eine NPE ((1-(2-Nitrophenyl)ethyl) Ester)-caging-group blockiert wird. Diese caging-group wird durch Bestrahlung mit UV-Licht einer Wellenlänge von  $\lambda \approx 300\text{-}360\text{ nm}$  (47) abgespalten. Dadurch wird das ATP frei und kann seine Wirkung entfalten. Der Vorteil des NPE-caged-ATP ist, dass ohne mechanische Irritation der Spheroide, wie etwa Pipettieren, eine bestimmte Menge ATP in der Versuchskammer freigesetzt werden kann. Durch den Versuchsaufbau war es möglich, die UV-Bestrahlung und somit die Aktivierung des ATP während der Videoaufzeichnung durchzuführen und den direkten Effekt des freigesetzten ATP zu beobachten. Jedoch hat NPE-caged-ATP nicht nur Vorteile: Man kann nicht davon ausgehen, dass sämtliches NPE-caged-ATP durch die UV-Bestrahlung photolytisch wurde, so dass mit einer niedrigeren Konzentration von aktivem ATP als NPE-caged-ATP gerechnet werden muss (27, 47).

Durch die UV-Bestrahlung zerfällt NPE-caged-ATP in freies ATP und Aci-Nitro-Anion, das sofort weiter zerfällt in Phosphat und Nitrosoacetophenon (7). Auch dieses Abspaltungsprodukt der Nitrophenylethyl-caging-group könnte einen Einfluss auf die Rotationsfrequenz der Spheroide gehabt haben: Bei Nitrosoacetophenon handelt es sich um einen reaktiven Stoff, der sich chemisch nicht inert verhält und einen Störfaktor für Spektralanalysen darstellt (16). Des Weiteren wurde beschrieben, dass es bei Nitrosoacetophenon zu Wechselwirkungen mit Proteinen und zur Freisetzung von Protonen kommen kann (1).

Da für ATP eine dosisabhängige Wirkung beschrieben ist, wurden für die Versuche drei unterschiedliche ATP-Konzentrationen gewählt:  $100\text{ }\mu\text{mol/l}$ ,  $1\text{ mmol/l}$  und  $10\text{ mmol/l}$ . In diesem Bereich wurden auch die in der Literatur beschriebenen Untersuchungen durchgeführt (37, 49, 50, 61, 65).



### 4.1.4.1.2. Disodium-ATP

In der zweiten Versuchsreihe wurde der Einfluss von Allergie und IL-13 auf die Rotationsfrequenz von Nasalepithel-Spheroïden untersucht. Zur Stimulation der mukoziliären Funktion wurde Adenosin 5'-Triphosphat Dinatrium-Salz verwendet. Dieses ATP liegt in bereits wirksamer Form vor. Dadurch konnte sichergestellt werden, dass die in den Versuchsansatz gegebene Menge ATP zur Stimulation der Rotationsfrequenz der Spheroïde zur Verfügung stand. Auch die Aliquotierung, Handhabung und Versuchsdurchführung war hier wesentlich unkomplizierter, weil man dieses ATP nicht, wie NPE-caged-ATP, vor einer vorzeitigen Aktivierung durch Lichteinfall schützen musste.

Der entscheidende Nachteil bei der Verwendung von freiem ATP gegenüber NPE-caged-ATP besteht darin, dass freies ATP nach Ablauf der Adaptationszeit und nach Bestimmung der basalen Rotationsfrequenz in die Versuchskammer pipettiert werden muss und es dabei zu einer mechanischen Irritation, Schwankung der Temperatur und somit zu einer zusätzlichen Beeinflussung der Rotationsfrequenz der Spheroïde kommen kann. Es wird berichtet, dass respiratorisches Epithel auf Stress wie Mediumwechsel oder Pipettieren mit Ausschüttung von ATP reagiert (13, 23, 25, 61, 76). Aus diesem Grund wurde eine möglichst kleine Menge ATP-Lösung langsam und vorsichtig in die Versuchskammer gegeben, um eine Irritation der Spheroïde gering zu halten.

Morse und Maurer führten Versuche mit respiratorischem Epithel in Durchflusskammern mit einem Fluss von 250 µl/min (49) bzw. 1,2 ml/h (45, 46) zur Bestimmung der ziliären Schlagfrequenz durch. Dabei wurden Komplikationen durch Ausschüttung von ATP nicht beschrieben. Es ist jedoch unklar, inwieweit diese Ergebnisse von Versuchen mit Monolayer-Kulturen zur ATP-Freisetzung und zur Untersuchung der ziliären Schlagfrequenz in Durchflusskammern auf das Spheroïd-Modell übertragen werden können. Um in dieser Arbeit eine Verfälschung der Ergebnisse durch das Pipettieren aufzudecken, wurde zur Kontrolle DMEM in die Kammer gegeben.

Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe hatten gezeigt, dass die ziliäre Funktion temperaturabhängig ist. Um eine Temperaturänderung durch die Zugabe von ATP zu verhindern wurde das ATP vor Versuchsbeginn auf 35 °C erwärmt. Zusätzlich wurde

während des gesamten Versuchsablaufs die Temperatur in der Versuchskammer kontinuierlich kontrolliert. Dabei fielen keine wesentlichen Temperaturschwankungen ( $> 0,5$  °C) auf.

Die Versuche wurden mit  $500 \mu\text{mol/l}$  ATP durchgeführt, da in der Literatur für diese Konzentration eine deutliche Steigerung der mukoziliären Funktion und der ziliären Schlagfrequenz beschrieben wurde (37, 49, 50, 65, 81).

### 4.1.4.2. Interleukin 13

IL-13 gilt als ein wesentlicher Faktor in der Pathophysiologie einer allergischen Reaktion vom Soforttyp, zu der unter anderem die allergische Rhinitis zählt (14, 15, 22, 56, 71, 77, 83). Es wirkt zum einen durch Aktivierung immunkompetenter Zellen. Zum anderen wird auch eine direkte Beeinflussung der Zellen des respiratorischen Epithels durch IL-13 vermutet: Nach Applikation von IL-13 kommt es innerhalb von sechs Stunden zur Ausbildung einer Hyperreagibilität, noch bevor eine Entzündungsreaktion stattfindet (71). Ebenso beschrieben wurden eine Erhöhung der Anzahl von Becherzellen, Störung der Differenzierung der Zilien sowie der Polarität des Epithels und Verlangsamung des Zilienschlages (39). Kuperman fand heraus, dass eine Erhöhung der Schleimsekretion durch eine direkte Wirkung von IL-13 auf die Zellen des respiratorischen Epithels vermittelt wird (38). Somit stellt IL-13 einen interessanten Zusatz bei der Untersuchung der mukoziliären Funktion gesunder Probanden und Patienten mit allergischer Rhinitis dar.

Übertragen auf die Untersuchung der mukoziliären Funktion anhand des Spheroid-Modells sind folgende Einflüsse von IL-13 denkbar:

- 1) IL-13 könnte durch seine direkte Wirkung die Zusammensetzung des Mukus verändern und so die mukoziliäre Funktion beeinflussen.
- 2) Da im Spheroid-Modell bereits ausdifferenziertes Epithel untersucht wird, kann IL-13 die Ziliogenese nicht mehr entscheidend beeinträchtigen. Aber die Inkubation mit IL-13 könnte zu einem rascheren Verlust der Zilien in Kultur sowie zu einer langsameren Schlagfrequenz der Zilien führen.
- 3) Die von Laoukili beschriebene Störung der Polarisierung der Zellen könnte sich auf die Zusammenlagerung der Zellen zu Spheroiden auswirken (39).

4) Es können auch indirekte Effekte von IL-13 im Spheroid-Modell eine Rolle spielen, da nicht auszuschließen ist, dass beim Bürstenabstrich eosinophile Granulozyten, Mastzellen und T-Lymphozyten mit entnommen wurden.

Entsprechend den Angaben in der Literatur wurden die Versuche mit einer IL-13-Konzentration von 10 ng/ml durchgeführt (14, 15, 39, 55, 68). Bei der Kultur der Nasalepithel-Spherioide ist zu beachten, dass nicht in jedes Well genau gleich viel Epithel versetzt wurde und es somit zu Ungenauigkeiten in der IL-13-Konzentration kommen konnte. Die Unterschiede in der Menge des Nasalepithels in den einzelnen Wells sollten durch Randomisierung bei der Zugabe von IL-13 ausgeglichen werden.

### **4.2. Diskussion der Ergebnisse in Versuchsreihe 1: Untersuchung der Stimulierbarkeit der mukoziliären Funktion mit NPE-caged-ATP**

#### **4.2.1. Kultur von Sphroiden aus Nasalepithel gesunder Probanden**

Nach maximal sieben Tagen in Kultur hatten sich aus den Zellen der Bürstenabstriche aller 18 Probanden Spherioide gebildet. Im Mittel betrug die Zahl der entstandenen Spherioide 80 pro Well. Im Gegensatz dazu waren in Versuchen mit Bronchialepithel in unserer Arbeitsgruppe nur 10-20 Spherioide pro Well entstanden. Möglicherweise konnte bei Bürstenabstrichen während einer Bronchoskopie nicht so viel Material entnommen werden oder die Bronchoskopie schädigte das Epithel stärker als die Probenentnahme aus der Nase. Zudem waren die Bronchoskopien bei Patienten durchgeführt worden, die erkrankt waren und unter Vormedikation standen. Die Abstriche von Nasalepithel waren bei gesunden Probanden ohne Vorerkrankungen oder Medikation entnommen worden.

Die Spherioide von 15 Probanden rotierten, dabei betrug der Anteil der rotierenden Spherioide im Mittel 6,06 %. Diese Ausbeute war ausreichend um Versuche durchführen zu können. Die Rotation der Spherioide erwies sich als sehr stabil: Nur vier Versuche mussten abgebrochen werden, weil die untersuchten Spherioide trotz optimaler Versuchsbedingungen nicht während des gesamten Versuches rotierten.

Somit konnte gezeigt werden, dass sich auch aus nasalem respiratorischem Epithel ausreichend rotierende Spherioide kultivieren lassen, um damit die mukoziliäre Funktion zu untersuchen.

### **4.2.2. Basale Rotationsfrequenz der Spherioide in Versuchsreihe 1**

Durch Vergleich der basalen Rotationsfrequenz der Spherioide sollte eine vorzeitige Aktivierung von NPE-caged-ATP vor UV-Bestrahlung sowie ein toxischer Effekt von NPE-caged-ATP ausgeschlossen werden. Es zeigte sich, dass die Spherioide der Kontrollgruppe (Versuchsgruppe 1 ohne NPE-caged-ATP) signifikant langsamer rotierten als die Spherioide der anderen drei Versuchsgruppen, bei denen NPE-caged-ATP in unterschiedlichen Konzentrationen in die Versuchskammer gegeben worden war. Dies deutet darauf hin, dass das NPE-caged-ATP bereits vor Versuchsbeginn teilweise oder komplett photolysiert und somit aktiviert worden war oder dass das ATP durch die NPE-caging-group nicht komplett blockiert war (1). Die oben genannten Ergebnisse werden im folgenden Abschnitt 4.2.3. ausführlicher diskutiert werden.

### **4.2.3. Stimulation der Rotationsfrequenz von Nasalepithel-Spheroiden durch NPE-caged-ATP in Konzentrationen von 100 $\mu\text{mol/l}$ bis 10 $\text{mmol/l}$ und Kontrolle ohne NPE-caged-ATP**

In der Kontrollgruppe (Versuchsgruppe 1 ohne NPE-caged-ATP) sollte zunächst gezeigt werden, dass eine Bestrahlung mit UV-Licht einer Wellenlänge von 365 nm über 10 Sekunden die Rotationsfrequenz der Nasalepithel-Spherioide nicht beeinflusst. Die ersten Messungen (10, 20, 30, 40 und 50 Sekunden) nach UV-Bestrahlung ergaben keine signifikante Änderung der Rotationsfrequenz. Lediglich bei der letzten Messung 60 Sekunden nach UV-Bestrahlung rotierten die Spherioide signifikant langsamer als vor UV-Bestrahlung. Ein Effekt der UV-Bestrahlung wurde somit nicht beobachtet.

In den Versuchen mit Versuchsgruppe 2-4 sollte untersucht werden, ob durch Aktivierung von NPE-caged-ATP die Rotationsfrequenz der Nasalepithel-Spherioide gesteigert werden kann. Dafür wurde NPE-caged-ATP in drei Konzentrationen, nämlich 100  $\mu\text{mol/l}$ , 1  $\text{mmol/l}$

## 4. Diskussion

---

und 10 mmol/l, in die Versuchskammer gegeben und durch Bestrahlung mit UV-Licht einer Wellenlänge von 365 nm über zehn Sekunden aktiviert.

In Versuchsgruppe 2 mit 100  $\mu$ M NPE-caged-ATP und in Versuchsgruppe 4 mit 10 mmol/l NPE-caged-ATP kam es während des gesamten Versuches zu keiner signifikanten Änderung der Rotationsfrequenz. In der Versuchsgruppe 3 mit 1 mmol/l NPE-caged-ATP rotierten die Spheroide, ebenso wie in der Kontrollgruppe ohne NPE-caged-ATP, 60 Sekunden nach UV-Bestrahlung signifikant langsamer. Der erwartete Anstieg der Rotationsfrequenz (49, 50) blieb aus. Folgende Ursachen könnten dafür verantwortlich sein, dass die Rotationsfrequenz von Nasalepithel-Spheroide nicht durch NPE-caged-ATP gesteigert werden konnte:

1) Das NPE-caged-ATP war bereits vor UV-Bestrahlung aktiv:

NPE-caged-ATP ist auch vor Aktivierung durch Photolyse nicht komplett in seiner Wirksamkeit blockiert. Es könnte also schon vor UV-Bestrahlung teilweise aktiv gewesen sein (1). Zudem könnte das NPE-caged-ATP trotz Arbeiten in abgedunkelten Räumen schon während des Aliquotierens oder des Versuchs vor UV-Bestrahlung teilweise oder komplett photolysiert worden sein. In beiden Fällen wäre dann möglicherweise nach UV-Bestrahlung ein Effekt des aktivierten ATP nicht mehr zu bestimmen gewesen, weil bereits vor UV-Bestrahlung das gesamte oder ein Teil des ATP nicht mehr blockiert war und somit nicht mehr zusätzlich aktiviert werden konnte. Die Spheroide wären schon vor UV-Bestrahlung stimuliert gewesen und hätten schneller rotiert. In einem Vergleich der basalen Rotationsfrequenz vor Aktivierung von NPE-caged-ATP zeigte sich, dass Spheroide der Kontrollgruppe (Versuchsgruppe 1 ohne NPE-caged-ATP) signifikant langsamer rotierten als Spheroide der anderen drei Versuchsgruppen, bei denen NPE-caged-ATP in verschiedenen Konzentrationen dem Versuchsansatz beigefügt worden war. Dies weist darauf hin, dass tatsächlich ein Teil oder das gesamte NPE-caged-ATP vor UV-Bestrahlung photolysiert oder nicht ausreichend blockiert war.

Geht man von einer vorzeitigen Photolyse des gesamten NPE-caged-ATP aus, so konnte durch UV-Bestrahlung kein weiteres ATP mehr aktiviert werden und die Rotationsfrequenz der Spheroide nicht weiter stimuliert werden. War allerdings nicht das gesamte NPE-caged-ATP vor UV-Bestrahlung photolysiert, so hätte nach UV-Bestrahlung eine höhere Konzentration von aktivem ATP vorgelegen, das die Rotationsfrequenz der Spheroide hätte steigern können. Es fand sich jedoch in keiner der drei Versuchsgruppen

## 4. Diskussion

---

mit NPE-caged-ATP ein Anstieg der Rotationsfrequenz nach UV-Bestrahlung.

Möglicherweise waren die ATP-Rezeptoren schon durch das vorzeitig aktivierte ATP besetzt oder es kam zu einer Sättigung, so dass eine weitere Erhöhung der ATP-Konzentration nach UV-Bestrahlung keinen Effekt mehr erzielen konnte (49).

2) Das NPE-caged-ATP wurde nicht in ausreichendem Maß photolysiert:

Durch UV-Bestrahlung wird NPE-caged-ATP nicht optimal photolysiert: Ishihara zeigte, dass nach 0,1 sec UV-Bestrahlung mit 100 W caged-probes photolysiert wurden. Die Photolyse durch Laser war jedoch um das Dreizehnfache effektiver als durch Bestrahlung mit einer UV-Lampe (27). Laut McCray sind 20 mJ und UV-Licht einer Wellenlänge von 347 nm notwendig, um aus 5 mmol/l NPE-caged-ATP 2 mmol/l ATP freizusetzen (47). Die optimale Wellenlänge zur Photolyse von caged-probes wird mit 300-360 nm angegeben (47). Die Bestrahlung erfolgte in den Versuchen dieser Arbeit mit UV-Licht einer Wellenlänge von 365 nm, also nicht ganz im optimalen Bereich.

Des Weiteren ist die  $H^+$ -Konzentration entscheidend für die Freisetzung des ATP: Bei einem pH-Wert von 7,0-7,4, wie er vom Hersteller für das DMEM angegeben wird, ist die Rate von freigesetztem ATP aus NPE-caged-ATP zwar nicht im maximalen Bereich, aber dennoch hoch (47).

Zusammenfassend muss davon ausgegangen werden, dass das NPE-caged-ATP nicht zu 100 % photolysiert wurde und die Konzentration von NPE-caged-ATP nicht mit der von aktiviertem ATP gleichzusetzen ist. Wie hoch die Konzentration von aktivem ATP wirklich war, wurde nicht untersucht. Die ATP-Konzentrationen waren aber relativ hoch gewählt, so dass auch bei geringeren Aktivierungsraten von ATP mit einem Effekt auf die Rotationsfrequenz gerechnet werden konnte.

3) Das Abspaltungsprodukt der Nitrophenylethyl-caging-group, das Nitrosoacetophenon, hatte möglicherweise einen negativen Einfluss auf die Rotationsfrequenz der Nasalepithel-Spheroide:

Bei Nitrosoacetophenon handelt es sich um einen reaktiven Stoff, von dem bekannt ist, dass er sich rasch chemisch verändern kann und einen Störfaktor für Spektralanalysen darstellt (16). Auch wurde beschrieben, dass es bei Verwendung von Nitrosoacetophenon zu Wechselwirkungen mit Proteinen kommen kann (1). Es ist also denkbar, dass Nitrosoacetophenon in irgendeiner Weise mit den Zilien selbst, den Zellen der Spheroide

oder dem Schleim interagierte. Zudem ist Nitrosoacetophenon auch in der Lage, Protonen frei zu setzen und so den pH-Wert des Mediums verändern (1). Über einen oder mehrere dieser Effekte von Nitrosoacetophenon könnte die Stimulation der Spheroid-Rotation behindert worden sein. In Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe, bei denen der Effekt von caged-Isoproterenol auf die Rotationsfrequenz von Bronchialepithel-Spheroide getestet wurde, stellte sich ebenfalls der Verdacht, dass die abgespaltete caging-group die Rotation der Spheroide negativ beeinflusste.

Kontrolluntersuchungen mit bereits vor Versuchsbeginn photolysiertem NPE-caged-ATP oder isoliertem Nitrosoacetophenon wurden in der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt. Geht man aber, wie oben beschrieben, davon aus, dass bereits vor UV-Bestrahlung ein Teil oder das komplette NPE-caged-ATP photolysiert war, so hätte sich ein toxischer Effekt in der basalen Rotationsfrequenz der Spheroide in Versuchen mit höheren NPE-caged-ATP-Konzentrationen gezeigt. Ein solcher lies sich jedoch nicht nachweisen.

- 4) Der Beobachtungszeitraum war zu kurz, um eine Steigerung der Rotationsfrequenz nach Aktivierung von NPE-caged-ATP nachzuweisen:

Morse beobachtete den Peak der ziliären Schlagfrequenz nach Zugabe von ATP nach ca. zwei Minuten. In den hier durchgeführten Versuchen wurde die Rotationsgeschwindigkeit der Spheroide nach Aktivierung von NPE-caged-ATP jedoch nur für zwei Minuten bestimmt. Es wäre also möglich gewesen, dass der Effekt von ATP erst gegen Ende oder nach Beendigung der Versuche eintrat. Dagegen sprechen Ergebnisse anderer Untersuchungen, bei denen ein sehr rascher (innerhalb weniger Sekunden) Eintritt der Wirkung von ATP, sowie eine schnellere Wirkung bei höheren Konzentrationen beschrieben wurde (42, 50). Demnach wäre zumindest eine leichte Erhöhung der Rotationsfrequenz der Spheroide im Beobachtungszeitraum von zwei Minuten zu erwarten gewesen.

### **4.3. Diskussion der Ergebnisse in Versuchsreihe 2: Versuche mit Nasalepithel-Spheroiden gesunder Probanden und Patienten mit allergischer Rhinitis nach Kultivierung mit oder ohne IL-13 und Stimulation durch freies ATP**

In dieser Versuchsreihe wurde die basale und stimulierte Rotationsfrequenz von Nasalepithel-Spheroiden gesunder Probanden und Patienten mit allergischer Rhinitis verglichen. Zusätzlich wurde der Einfluss von IL-13 auf die Kultur und Rotation der Spheroide untersucht.

Nachdem sich in Versuchsreihe 1 gezeigt hatte, dass die Rotationsfrequenz von Nasalepithel-Spheroiden mit NPE-caged-ATP in unserem Versuchsansatz nicht erhöht werden kann, wurde in Versuchsreihe 2 freies, bereits aktives Disodium-ATP in einer Konzentration von 0,5 mmol/l zur Stimulation der Rotationsfrequenz der Spheroide verwendet.

#### **4.3.1. Kultur von Nasalepithel-Spheroiden gesunder Probanden und allergischer Patienten mit und ohne IL-13**

Wie in Versuchsreihe 1 waren auch hier ausreichend rotierende Spheroide entstanden, um damit Versuche durchzuführen. In der Kultur von Nasalepithel-Spheroiden ergaben sich hinsichtlich der Zahl, dem Anteil der rotierenden Spheroide und deren Durchmesser keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Die Untersuchungen dieser Arbeit zeigten keinen Einfluss von Allergie oder Inkubation mit IL-13 auf die Entstehung von Nasalepithel-Spheroiden. Kultivierung der Spheroide mit IL-13 veränderte nicht den Anteil der rotierenden Spheroide oder deren Durchmesser. Laoukili berichtet, dass IL-13 die Polarisation der Epithelzellen durch eine gestörte Expression der dafür verantwortlichen Proteine negativ beeinflusst (39). Aufgrund dieser Ergebnisse hätte man davon ausgehen können, dass sich in Kultur mit IL-13 weniger Spheroide zusammenlagern und diese vielleicht langsamer oder überhaupt nicht rotieren. Allerdings verwendete Laoukili Zellen einer aufgelösten Monolayer-Kultur von respiratorischem Epithel für die Untersuchungen. Somit können diese Ergebnisse nicht ohne weiteres auf die Kultur von Spheroiden aus bereits ausdifferenzierten Nasalepithelzellen übertragen werden (39).



### 4.3.2. Vergleich der basalen Rotationsfrequenz

In Versuchsreihe 2 wurde vor Stimulation durch ATP zunächst die basale Rotationsfrequenz der Nasalepithel-Spheroide über zwei Minuten bestimmt. Zwischen den vier Versuchsgruppen (Spheroide gesunder Probanden ohne und mit IL-13 kultiviert und Spheroide allergischer Probanden ohne und mit IL-13 in Kultur) zeigte sich kein signifikanter Unterschied der basalen Rotationsfrequenz. Weder die Diagnose allergische Rhinitis noch die Inkubation mit IL-13 beeinflussten die basale Rotationsfrequenz der Nasalepithel-Spheroide. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Untersuchungen von Wanner und Bayram, die zeigten, dass die ziliäre Schlagfrequenz bei Allergikern und Gesunden gleich ist (4, 74). Andererseits gibt es auch Arbeiten, die von einer mukoziliären Dysfunktion bei Allergikern berichten (3, 52, 64). Möglicherweise hängt die mukoziliäre Dysfunktion der Allergiker auch mit einem allergischen Asthma-Anfall zusammen oder tritt saisonal bei der allergischen Rhinitis auf und zeigt sich nicht im Intervall. Pavia beschrieb allerdings bei Asthmatikern auch in Remission eine verlangsamte mukoziliäre Funktion (52). In dieser Arbeit wurde bei Allergikern nicht zwischen perennialer allergischer Rhinitis und saisonaler allergischer Rhinitis unterschieden. Die Proben von Allergikern wurden nicht während der jeweiligen Rhinitis-Zeit entnommen. Ein Vergleich der mukoziliären Funktion bei Allergikern während der Allergie-Saison und in Remission wurde nicht durchgeführt.

Laoukili zeigte, dass in Spheroidkulturen von nasalem respiratorischem Epithel unter Einfluss von IL-13 weniger zilientragende Zellen entstehen und die Zilien langsamer schlagen (39). In der vorliegenden Untersuchung hatte IL-13 keinen Einfluss auf die basale Rotationsfrequenz der Spheroide. Diese unterschiedlichen Ergebnisse könnten durch die Kultivierung der Zellen bedingt sein: Laoukili kultivierte Spheroide über drei Wochen aus gelösten Monolayer-Kulturen, bei denen es erst zur Ziliogenese kommen musste. In unserer Arbeit hingegen lagerten sich die Spheroide aus bereits differenzierten Zellen eines Bürstenabstriches innerhalb einer Woche zusammen. IL-13 konnte so möglicherweise nicht über eine Beeinflussung der Ziliogenese wirken.

### 4.3.3. Stimulation der Rotationsfrequenz durch Disodium-ATP

#### 4.3.3.1. Kontrollmessungen mit DMEM

Zur Stimulation der Rotationsfrequenz wurde in dieser Versuchsreihe bereits aktives ATP verwendet. Dieses ATP musste während des Versuches in die Versuchskammer pipettiert werden. Bisherige Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe ergaben, dass die Spheroiden sehr empfindlich auf jede mechanische Irritation reagieren. Um eine mögliche Verfälschung der Ergebnisse durch das Pipettieren aufzudecken, wurde DMEM in die Versuchskammer pipettiert. Für alle Versuche schwammen die Spheroiden in DMEM in der Versuchskammer, so dass sich dieses Medium als Kontrollsubstanz ohne zu erwartenden Einfluss auf die Rotation der Spheroiden anbot.

In Versuchen nach Protokoll A wurde DMEM zwei Minuten nach der Zugabe von ATP in die Versuchskammer gegeben. Die Zugabe von DMEM erfolgte also nach Stimulation der Rotationsfrequenz. Die Spheroiden allergischer Patienten, die ohne IL-13 kultiviert worden waren, rotierten nach Zugabe von DMEM signifikant langsamer. In den übrigen drei Versuchsgruppen führte die Zugabe von DMEM zu keiner signifikanten Änderung der Rotationsfrequenz.

In Versuchen nach Protokoll B wurde DMEM vor Stimulation durch ATP in die Versuchskammer gegeben. Nur bei Spheroiden allergischer Patienten ohne IL-13-Inkubation blieb die Rotationsfrequenz stabil. Bei Spheroiden gesunder Probanden mit und ohne IL-13 in Kultur und Spheroiden allergischer Patienten, die mit IL-13 kultiviert worden waren, kam es nach Zugabe von DMEM zu einem statistisch signifikanten Abfall der Rotationsfrequenz.

Wurden alle Messwerte nach Zugabe von DMEM aus beiden Versuchsprotokollen zusammengefasst, zeigte sich in allen vier Versuchsgruppen ein signifikanter Abfall der Rotationsfrequenz. Unterschiede in der Rotationsfrequenz nach Zugabe von DMEM zwischen den einzelnen Versuchsgruppen fanden sich nicht.

Watt und Grygorczyk berichten, dass respiratorisches Epithel auf das Hinzupipettieren von Medium mit Sekretion von ATP (23, 76) reagiert. Es wäre also eine Erhöhung der Rotationsfrequenz durch die Freisetzung von ATP zu erwarten gewesen. Die

Rotationsfrequenz der Spheroiden blieb jedoch nach Zugabe von DMEM stabil oder fiel sogar ab. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass in unserem Versuchsansatz durch Pipettiervorgänge eine zusätzliche Stimulation auf die Rotationsfrequenz der Spheroiden ausgeübt wurde. Ein stimulierender Effekt von ATP auf die Rotationsfrequenz wäre nicht fälschlicherweise verstärkt worden.

Eine Erklärung für den beobachteten Abfall der Rotationsfrequenz nach Zugabe von DMEM wäre eine Veränderung der Temperatur: Frühere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass die Rotationsfrequenz der Spheroiden temperaturabhängig ist. Das DMEM wurde vor dem Hinzugeben in die Versuchskammer auf 35 °C, die gleiche Temperatur die in der Versuchskammer herrschte, erwärmt. Zusätzlich wurde die Temperatur in der Versuchskammer während des gesamten Versuchsablaufes gemessen und es wurden keine Schwankungen registriert. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich die Temperatur in der Versuchskammer nach der Zugabe von DMEM minimal veränderte und dies die Rotationsfrequenz der Spheroiden beeinträchtigte.

Auch die mechanische Irritation durch das Pipettieren oder ein Wegspülen der Spheroiden aus dem sie umgebendem Mukus könnte für die langsamere Rotation nach DMEM verantwortlich gewesen sein.

### 4.3.3.2. Stimulation durch Disodium-ATP

Bei Nasalepithel-Spheroiden von gesunden Probanden, die ohne IL-13 kultiviert wurden, war ATP in Versuchsprotokoll A und B in der Lage, die Rotationsfrequenz signifikant zu erhöhen. Fasst man die Werte nach Zugabe von ATP aus beiden Versuchsprotokollen zusammen und vergleicht sie mit dem Ausgangswert, so zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Rotationsfrequenz. Im Vergleich der stimulierten Rotationsfrequenz der vier Versuchsgruppen rotierten die Spheroiden gesunder Probanden ohne IL-13 in Kultur signifikant schneller als die Spheroiden gesunder Probanden mit IL-13 in Kultur und Spheroiden von allergischen Patienten, die mit oder ohne IL-13 kultiviert worden waren.

Wurden die Nasalepithel-Spheroiden der gesunden Probanden mit IL-13 kultiviert, so fand sich in der Zusammenfassung aller Werte nach Zugabe von ATP ein signifikanter, jedoch etwas geringerer Anstieg der Rotationsfrequenz. Dieses Ergebnis zeigt, dass durch in die

#### 4. Diskussion

---

Versuchskammer pipettiertes ATP in einer Konzentration von 0,5 mmol/l, wie erwartet, die Rotationsfrequenz von Nasalepithel-Spheroïden gesunder Probanden gesteigert werden kann. Levin, Morse, Ovadyahu und kamen zu ähnlichen Ergebnissen (42, 49, 50). Die Inkubation mit IL-13 hatte jedoch einen Einfluss auf die Antwort auf ATP: Spheroïde gesunder Probanden, die mit IL-13 kultiviert wurden, erhöhten nach Stimulation durch ATP ihre Rotationsfrequenz nicht so ausgeprägt wie Spheroïde gesunder Probanden ohne IL-13 in Kultur. Nach den Untersuchungen Laoukilis war ein solcher negativer Effekt von IL-13 zu erwarten gewesen (39). Interessanterweise zeigte sich der negative Einfluss von IL-13 auf die mukoziliäre Funktion erst nach Stimulation durch ATP. Möglicherweise war der Effekt von IL-13 an den Nasalepithel-Spheroïden gesunder Probanden nicht so stark ausgeprägt, dass er sich bereits in der basalen Rotationsfrequenz zeigte. So konnte die Rotationsfrequenz der mit IL-13 kultivierten Spheroïde nur nicht so ausgeprägt gesteigert werden wie die von Spheroïden ohne IL-13 in Kultur. Auf welche Weise IL-13 die Rotationsfrequenz der Spheroïde beeinflusste ist nicht klar. Möglich wäre eine direkte Beeinflussung der ziliären Schlagfrequenz, Verminderung der Zilienzahl oder Veränderung der Zusammensetzung des Mukus (38, 39). Anhand der Versuche dieser Arbeit können dazu keine Aussagen gemacht werden.

Spheroïde von Patienten mit allergischer Rhinitis, die ohne IL-13 kultiviert wurden, erhöhten weder in Versuchsprotokoll A noch in Versuchsprotokoll B ihre Rotationsfrequenz nach Zugabe von ATP. Auch in der Zusammenfassung aller Messwerte nach Zugabe von ATP zeigte sich kein signifikanter Unterschied gegenüber der basalen Rotationsfrequenz. Dieses Ergebnis könnte der in der Literatur beschriebenen mukoziliären Dysfunktion bei Allergikern entsprechen (3, 9, 64): In der basalen Rotationsfrequenz der Spheroïde zeigte sich noch kein Unterschied zwischen gesunden Probanden und Patienten mit allergischer Rhinitis. Durch Zugabe von ATP konnte die Rotationsfrequenz der Spheroïde allergischer Probanden ohne IL-13-Inkubation jedoch nicht erhöht werden. Wie auch bei den Spheroïden gesunder Probanden (s. oben), fällt auch hier auf, dass sich ein Unterschied in der Rotationsfrequenz gegenüber den anderen Versuchsgruppen erst nach Stimulation zeigt. Möglicherweise erklärt dies, warum es in verschiedenen Untersuchungen zu unterschiedlichen Ergebnissen bezüglich der mukoziliären Funktion von Allergikern kam (3, 4, 9, 64, 73, 74).

## 4. Diskussion

---

Bei Spheroiden von Patienten mit allergischer Rhinitis, die mit IL-13 inkubiert wurden, kam es weder in Versuchsprotokoll A noch in Versuchsprotokoll B zu einer signifikanten Erhöhung der Rotationsfrequenz nach Zugabe von ATP. Im zusammenfassenden Vergleich aller Werte nach Zugabe von ATP zeigte sich eine geringe signifikante Steigerung der Rotationsfrequenz. Zwischen Spheroiden allergischer Patienten mit IL-13 und Spheroiden gesunder Probanden mit IL-13 ergab sich kein signifikanter Unterschied in der stimulierten Rotationsfrequenz. Nach Zugabe von ATP rotierten Spheroide allergischer Patienten mit IL-13 in Kultur signifikant schneller als Spheroide allergischer Patienten ohne IL-13 in Kultur. Dieses Ergebnis überrascht. Anhand der Ergebnisse in den anderen Versuchsgruppen und Untersuchungen in der Literatur hätte man bei Spheroiden allergischer Patienten mit IL-13 in Kultur, ebenso wie bei Spheroiden allergischer Probanden ohne IL-13 in Kultur, keine Erhöhung der Rotationsfrequenz bzw. eine Verschlechterung der Antwort auf ATP erwartet (3, 39, 64). Vielleicht bietet die Methode des Spheroid-Modells eine Erklärung: IL-13 kann eine vermehrte Produktion von Mukus hervorrufen (38). Möglicherweise war eine größere Menge Mukus im Spheroid-Modell von Vorteil, so dass die mukoziliäre Funktion der Allergiker durch IL-13 verbessert wurde und eine Reaktion auf ATP ermöglichte. Diese Theorie steht allerdings im Widerspruch zu dem Ergebnis, dass IL-13 bei Spheroiden gesunder Probanden die Antwort auf ATP abschwächte. Vielleicht können zukünftige Untersuchungen eine genaue Erklärung für diese Ergebnisse liefern.

### 5. Zusammenfassung

#### 5.1. Ziele

Ziel dieser Arbeit war es, anhand von Nasalepithel-Spheroide den Einfluss von IL-13 auf die mukoziliäre Funktion und deren Stimulierbarkeit durch ATP bei gesunden Probanden und Patienten mit allergischer Rhinitis zu untersuchen.

Bei Nasalepithel-Spheroide handelt es sich um kugelige, zystische Konglomerate, die sich innerhalb von 48 Stunden aus nasalem respiratorischem Epithel zusammenlagern. Für die Kultur der Spheroide wurde durch Bürstenabstrich entnommenes nasales respiratorisches Epithel der Nase in flüssigem Medium schwimmend kultiviert. Die Oberfläche der Spheroide wird von den Zellen des nasalen respiratorischen Epithels gebildet. Durch den koordinierten Schlag der Zilien auf ihrer Oberfläche rotieren die Nasalepithel-Spheroide in ihrem eigenen Schleim um ihre Achse. Die Frequenz ihrer Rotation wurde als Parameter für die mukoziliäre Funktion verwendet.

In der ersten Versuchsreihe wurde getestet, ob die Rotationsfrequenz von Nasalepithel-Spheroide gesunder Probanden durch Stimulation mit NPE-caged-ATP erhöht werden kann. ATP wurde verwendet, da es als starker Stimulus der mukoziliären Funktion bekannt ist. NPE-caged-ATP schien für diese Versuche besonders geeignet, da es sich hierbei um ein Molekül handelt, dessen Aktivität durch eine Seitengruppe blockiert wird. Durch Bestrahlung mit UV-Licht wird die Seitengruppe abgespalten und ATP liegt in seiner aktiven Form vor. Das NPE-caged-ATP konnte bei Versuchsbeginn in die Versuchskammer gegeben werden und wurde nach Messung der basalen Rotationsfrequenz ohne mechanische Irritation der Spheroide aktiviert.

In einer zweiten Versuchsreihe wurde das nasale respiratorische Epithel von gesunden Probanden und von Patienten mit allergischer Rhinitis zur Hälfte mit IL-13 und zur anderen Hälfte, als Kontrolle, ohne IL-13 kultiviert. Dabei sollte untersucht werden, ob IL-13 einen Einfluss auf die Kultur und Rotationsfrequenz von Nasalepithel-Spheroide hat und sich Unterschiede zwischen gesunden Probanden und Patienten mit allergischer Rhinitis zeigen.

IL-13 wurde für diese Untersuchungen ausgewählt, da dieses Zytokin einen wesentlichen Faktor bei der Entstehung einer allergischen Hyperreagibilität darstellt und die ziliäre Schlagfrequenz vermindert. Zusätzlich wurde anhand dieser Nasalepithel-Spheroide die Stimulierbarkeit der Rotationsfrequenz der Nasalepithel-Spheroide durch freies Disodium-ATP, das während der Versuche in die Versuchskammer pipettiert wurde, untersucht. Es wurde freies ATP verwendet, nachdem die Versuche mit caged-ATP negativ ausgefallen waren.

### 5.2. Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Bei der Kultur der Nasalepithel-Spheroide wurden folgende Gesichtspunkte beurteilt: Dauer der Kultur, Zahl der entstandenen Spheroide, Anteil der rotierenden Spheroide, sowie Durchmesser der rotierenden Spheroide. Es zeigten sich hinsichtlich dieser Parameter keine Unterschiede zwischen Nasalepithel-Spheroiden gesunder Probanden und Patienten mit allergischer Rhinitis. Die Inkubation mit IL-13 hatte keinen Einfluss auf diese Größen.
2. Die Rotationsfrequenz der Nasalepithel-Spheroide gesunder Probanden konnte durch NPE-caged-ATP in Konzentrationen von  $10^{-4}$  bis  $10^{-2}$  mol/l nicht gesteigert werden. Dieses Ergebnis zeigt, dass NPE-caged-ATP in diesem Versuchsansatz nicht geeignet war, die Rotationsfrequenz von Nasalepithel-Spheroiden zu erhöhen.
3. Die basale Rotationsfrequenz war bei Nasalepithel-Spheroiden gesunder Probanden und Patienten mit allergischer Rhinitis, jeweils mit und ohne Inkubation mit IL-13, gleich. Eine mukoziliäre Dysfunktion der Patienten mit allergischer Rhinitis oder ein negativer Einfluss der IL-13-Inkubation ließen sich in der basalen Rotationsfrequenz der Nasalepithel-Spheroide nicht feststellen.
4. Die Rotationsfrequenz der Nasalepithel-Spheroide gesunder Probanden ließ sich durch Zugabe von freiem ATP in die Versuchskammer signifikant erhöhen. Inkubation mit IL-13 verschlechterte bei Nasalepithel-Spheroiden gesunder Probanden die Antwort auf ATP. Dies könnte ein Hinweis auf direkte Effekte von IL-13 auf das respiratorische Epithel sein.

5. Nasalepithel-Spheroide von Patienten mit allergischer Rhinitis, die ohne IL-13 kultiviert wurden, steigerten nach Zugabe von ATP ihre Rotationsfrequenz nicht. Dagegen erhöhten Nasalepithel-Spheroide von Patienten mit allergischer Rhinitis, die mit IL-13 kultiviert wurden, nach Stimulation durch ATP ihre Rotationsfrequenz zwar nur gering, jedoch signifikant. Im fehlenden Anstieg der Rotationsfrequenz der Spheroide von Patienten mit allergischer Rhinitis, die ohne IL-13 kultiviert wurden, zeigt sich möglicherweise die bei Allergikern beschriebene mukoziliäre Dysfunktion.
6. Nach Stimulation rotierten Spheroide gesunder Probanden ohne IL-13-Inkubation signifikant schneller als Spheroide von Patienten mit allergischer Rhinitis, die mit IL-13 kultiviert wurden. Auch das könnte eine Folge der mukoziliären Dysfunktion bei Allergikern sein.
7. Nach Zugabe von DMEM in die Versuchskammer blieb die Rotationsfrequenz der Spheroide stabil oder fiel ab. Dies zeigt, dass die mechanische Irritation beim Hinzugeben von Flüssigkeiten in die Versuchskammer nicht die stimulierende Wirkung von ATP verfälschte.

### 5.3. Schlussfolgerung

Die Ergebnisse führen zur Schlussfolgerung, dass die Nasalepithel-Spheroid-Methode geeignet ist, die mukoziliäre Funktion und ihre pharmakologische Beeinflussbarkeit zu untersuchen.

Eine mukoziliäre Dysfunktion zeigt sich bei Patienten mit allergischer Rhinitis darin, dass die Rotationsfrequenz der Nasalepithel-Spheroide dieser Patienten nicht durch Zugabe von ATP gesteigert werden kann.

IL-13 hat möglicherweise einen direkten Einfluss auf nasales respiratorisches Epithel: Bei gesunden Probanden verschlechtert es die Antwort auf ATP. Bei Allergikern bewirkt IL-13 hingegen eine erhöhte Stimulierbarkeit der mukoziliären Funktion durch ATP, die jedoch nicht das Niveau gesunder Probanden erreicht.



### 5.4. Ausblick auf zukünftige Fragestellungen

- Ein Vergleich der Ergebnisse aus Untersuchungen mit dem Spheroid-Modell und In-Vivo-Methoden zur Bestimmung der mukoziliären Funktion könnte zeigen, in wie weit die Ergebnisse des Spheroid-Modells auf die Situation in vivo übertragbar sind.
- In weiteren Versuchen könnte die mukoziliären Funktion von Patienten mit allergischer Rhinitis zu unterschiedlichen Zeitpunkten, nämlich im asymptomatischen Intervall und während der Rhinitisphase, sowie von Patienten mit perennialer Rhinitis verglichen werden.
- Eine interessante Fragestellung wäre auch ein Vergleich der mukoziliären Funktion von Patienten mit chronischer Sinusitis, Polyposis nasi, zystischer Fibrose, Karthagener-Syndrom oder anderen Krankheitsbildern im Spheroid-Modell.
- Ferner könnte der Einfluss weiterer Zytokine oder Pharmaka auf die Kultur von Nasalepithel-Spheroiden und deren Rotationsfrequenz untersucht werden.
- Von Interesse wären auch Untersuchungen zur Reaktion der Rotationsfrequenz der Nasalepithel-Spheroide auf verschiedene Substanzen, zum Beispiel weitere Nukleotide, Pharmaka, Allergene oder Umweltschadstoffe.

### 6. Abkürzungen

<b>AECBM:</b>	Airway epithelial cell basal medium
<b>ATP:</b>	Adenosin 5`Triphosphat
<b>B-Zellen:</b>	B-Lymphozyten
<b>CD:</b>	Cluster of Differentiation
<b>DAG:</b>	Diacylglycerin
<b>DMEM:</b>	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
<b>EGF:</b>	Epidermal Growth Factor
<b>IgE:</b>	Immunglobulin E
<b>IL:</b>	Interleukin
<b>IL-13:</b>	Interleukin 13
<b>IP 3:</b>	Inositoltriphosphat
<b>MHC:</b>	Major Histocompability Complex
<b>n:</b>	Anzahl
<b>NCS:</b>	Newborn Calf Serum
<b>NPE:</b>	(1-(2-Nitophenyl)ethyl) Ester
<b>NO:</b>	Sickstoffmonoxid
<b>One way ANOVA:</b>	One Way Analysis of Variance
<b>One Way RM ANOVA :</b>	One Way Repeated Mesuares Analysis of Variance
<b>P2:</b>	Purinozeptor Typ 2
<b>R:</b>	Rotationsfrequenz
<b>t:</b>	Zeit
<b>TH:</b>	Thymozyten-Helferzellen
<b>U:</b>	Umdrehungen
<b>UV:</b>	ultraviolett

### 7. Literaturverzeichnis

1. Adams SR, Tsien RY. Controlling cell chemistry with caged compounds. *Annu Rev Physiol* 1993; 55:755-784.
2. Akaiwa M, Yu B, Umeshita-Suyama R, Terada N, Suto H, Koga T et al. Localization of human interleukin 13 receptor in non-haematopoietic cells. *Cytokine* 2001; 13(2):75-84.
3. Bateman JR, Pavia D, Sheahan NF, Agnew JE, Clarke SW. Impaired tracheobronchial clearance in patients with mild stable asthma. *Thorax* 1983; 38(6):463-467.
4. Bayram H, Devalia JL, Khair OA, Abdelaziz MM, Sapsford RJ, Sagai M et al. Comparison of ciliary activity and inflammatory mediator release from bronchial epithelial cells of nonatopic nonasthmatic subjects and atopic asthmatic patients and the effect of diesel exhaust particles in vitro. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102(5):771-782.
5. Bridges MA, Walker DC, Harris RA, Wilson BR, Davidson AG. Cultured human nasal epithelial multicellular spheroids: polar cyst-like model tissues. *Biochem Cell Biol* 1991; 69(2-3):102-108.
6. Brombacher F. The role of interleukin-13 in infectious diseases and allergy. *Bioessays* 2000; 22(7):646-656.
7. Cepus V, Ulbrich C, Allin C, Troullier A, Gerwert K. Fourier transform infrared photolysis studies of caged compounds. *Methods Enzymol* 1998; 291:223-245.
8. Chilvers MA, O'Callaghan C. Analysis of ciliary beat pattern and beat frequency using digital high speed imaging: comparison with the photomultiplier and photodiode methods. *Thorax* 2000; 55(4):314-317.

9. Del Donno M, Bittesnich D, Chetta A, Olivieri D, Lopez-Vidriero MT. The effect of inflammation on mucociliary clearance in asthma: an overview. *Chest* 2000; 118(4):1142-1149.
10. DeLong PA, Kotloff RM. An overview of pulmonary host defense. *Semin Roentgenol* 2000; 35(2):118-123.
11. Devalia JL, Sapsford RJ, Wells CW, Richman P, Davies RJ. Culture and comparison of human bronchial and nasal epithelial cells in vitro. *Respir Med* 1990; 84(4):303-312.
12. 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; 158(5):2406-2413.
13. 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; 6(11):969-982.
14. Doucet C, Brouty-Boye D, Pottin-Clemenceau C, Jasmin C, Canonica GW, Azzarone B. IL-4 and IL-13 specifically increase adhesion molecule and inflammatory cytokine expression in human lung fibroblasts. *Int Immunol* 1998; 10(10):1421-1433.
15. Doucet C, Brouty-Boye D, Pottin-Clemenceau C, Canonica GW, Jasmin C, Azzarone B. Interleukin (IL) 4 and IL-13 act on human lung fibroblasts. Implication in asthma. *J Clin Invest* 1998; 101(10):2129-2139.
16. Du X, Frei H, Kim SH. Comparison of nitrophenylethyl and hydroxyphenacyl caging groups. *Biopolymers* 2001; 62(3):147-149.
17. Evans JH, Sanderson MJ. Intracellular calcium oscillations induced by ATP in airway epithelial cells. *Am J Physiol* 1999; 277(1 Pt 1):L30-L41.

## 7. Literaturverzeichnis

---

18. Evans JH, Sanderson MJ. Intracellular calcium oscillations regulate ciliary beat frequency of airway epithelial cells. *Cell Calcium* 1999; 26(3-4):103-110.
19. Finkelman FD, Urban JF, Jr. The other side of the coin: the protective role of the TH2 cytokines. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107(5):772-780.
20. Foster WM. Mucociliary transport and cough in humans. *Pulm Pharmacol Ther* 2002; 15(3):277-282.
21. Frigas E, Loegering DA, Solley GO, Farrow GM, Gleich GJ. Elevated levels of the eosinophil granule major basic protein in the sputum of patients with bronchial asthma. *Mayo Clin Proc* 1981; 56(6):345-353.
22. Grunig G, Ford JG, Donaldson DD, Venkayya R, McArthur C, Hansell E et al. Roles of interleukin-13 and interferon-gamma in lung inflammation. *Chest* 2002; 121(3 Suppl):88S.
23. Grygorczyk R, Hanrahan JW. CFTR-independent ATP release from epithelial cells triggered by mechanical stimuli. *Am J Physiol* 1997; 272(3 Pt 1):C1058-C1066.
24. Ho JC, Chan KN, Hu WH, Lam WK, Zheng L, Tipoe GL et al. The effect of aging on nasal mucociliary clearance, beat frequency, and ultrastructure of respiratory cilia. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163(4):983-988.
25. Homolya L, Steinberg TH, Boucher RC. Cell to cell communication in response to mechanical stress via bilateral release of ATP and UTP in polarized epithelia. *J Cell Biol* 2000; 150(6):1349-1360.
26. Igarashi Y, Goldrich MS, Kaliner MA, Irani AM, Schwartz LB, White MV. Quantitation of inflammatory cells in the nasal mucosa of patients with allergic rhinitis and normal subjects. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 95(3):716-725.
27. Ishihara A, Gee K, Schwartz S, Jacobson K, Lee J. Photoactivation of caged compounds in single living cells: an application to the study of cell locomotion. *Biotechniques* 1997; 23(2):268-274.

## 7. Literaturverzeichnis

---

28. Izuhara K, Umeshita-Suyama R, Akaiwa M, Shirakawa T, Deichmann KA, Arima K et al. Recent advances in understanding how interleukin 13 signals are involved in the pathogenesis of bronchial asthma. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz )* 2000; 48(6):505-512.
29. Jorissen M, Van der SB, Van den BH, Cassiman JJ. The preservation and regeneration of cilia on human nasal epithelial cells cultured in vitro. *Arch Otorhinolaryngol* 1989; 246(5):308-314.
30. Jorissen M, Van der SB, Van den BH, Cassiman JJ. Contribution of in vitro culture methods for respiratory epithelial cells to the study of the physiology of the respiratory tract. *Eur Respir J* 1991; 4(2):210-217.
31. Jorissen M, Bessems A. Normal ciliary beat frequency after ciliogenesis in nasal epithelial cells cultured sequentially as monolayer and in suspension. *Acta Otolaryngol* 1995; 115(1):66-70.
32. Jorissen M, Bessems A. Influence of culture duration and ciliogenesis on the relationship between ciliary beat frequency and temperature in nasal epithelial cells. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1995; 252(8):451-454.
33. Jorissen M. Correlations among mucociliary transport, ciliary function, and ciliary structure. *Am J Rhinol* 1998; 12(1):53-58.
34. Jorissen M, Willems T, Van der SB. Nasal ciliary beat frequency is age independent. *Laryngoscope* 1998; 108(7):1042-1047.
35. Jorissen M, Willems T, De Boeck K. Diagnostic evaluation of mucociliary transport: from symptoms to coordinated ciliary activity after ciliogenesis in culture. *Am J Rhinol* 2000; 14(5):345-352.
36. Knowles MR, Boucher RC. Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *J Clin Invest* 2002; 109(5):571-577.

## 7. Literaturverzeichnis

---

37. 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; 508 ( Pt 3):703-720.
38. Kuperman DA, Huang X, Koth LL, Chang GH, Dolganov GM, Zhu Z et al. Direct effects of interleukin-13 on epithelial cells cause airway hyperreactivity and mucus overproduction in asthma. *Nat Med* 2002; 8(8):885-889.
39. Laoukili J, Perret E, Willems T, Minty A, Parthoens E, Houcine O et al. IL-13 alters mucociliary differentiation and ciliary beating of human respiratory epithelial cells. *J Clin Invest* 2001; 108(12):1817-1824.
40. 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; 275(40):31061-31068.
41. Lethem MI, Dowell ML, Van Scott M, Yankaskas JR, Egan T, Boucher RC et al. Nucleotide regulation of goblet cells in human airway epithelial explants: normal exocytosis in cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993; 9(3):315-322.
42. Levin R, Braiman A, Priel Z. Protein kinase C induced calcium influx and sustained enhancement of ciliary beating by extracellular ATP. *Cell Calcium* 1997; 21(2):103-113.
43. Li Y, Simons FE, HayGlass KT. Environmental antigen-induced IL-13 responses are elevated among subjects with allergic rhinitis, are independent of IL-4, and are inhibited by endogenous IFN-gamma synthesis. *J Immunol* 1998; 161(12):7007-7014.
44. Matsui H, Randell SH, Peretti SW, Davis CW, Boucher RC. Coordinated clearance of periciliary liquid and mucus from airway surfaces. *J Clin Invest* 1998; 102(6):1125-1131.

## 7. Literaturverzeichnis

---

45. Maurer DR, Sielczak M, Oliver W, Jr., Abraham WM, Wanner A. Role of ciliary motility in acute allergic mucociliary dysfunction. *J Appl Physiol* 1982; 52(4):1018-1023.
46. Maurer DR, Schor J, Sielczak M, Wanner A, Abraham WM. Ciliary motility in airway anaphylaxis. *Prog Clin Biol Res* 1982; 80:67-70.
47. McCray JA, Trentham DR. Properties and uses of photoreactive caged compounds. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* 1989; 18:239-270.
48. Morales B, Barrera N, Uribe P, Mora C, Villalon M. Functional cross talk after activation of P2 and P1 receptors in oviductal ciliated cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 279(3):C658-C669.
49. 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; 280(6):C1485-C1497.
50. Ovadyahu D, Eshel D, Priel Z. Intensification of ciliary motility by extracellular ATP. *Biorheology* 1988; 25(3):489-501.
51. Paradiso AM, Ribeiro CM, Boucher RC. Polarized signaling via purinoceptors in normal and cystic fibrosis airway epithelia. *J Gen Physiol* 2001; 117(1):53-67.
52. Pavia D, Bateman JR, Sheahan NF, Agnew JE, Clarke SW. Tracheobronchial mucociliary clearance in asthma: impairment during remission. *Thorax* 1985; 40(3):171-175.
53. Pawankar RU, Okuda M, Hasegawa S, Suzuki K, Yssel H, Okubo K et al. Interleukin-13 expression in the nasal mucosa of perennial allergic rhinitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152(6 Pt 1):2059-2067.
54. Pedersen PS, Holstein-Rathlou NH, Larsen PL, Qvortrup K, Frederiksen O. Fluid absorption related to ion transport in human airway epithelial spheroids. *Am J Physiol* 1999; 277(6 Pt 1):L1096-L1103.



## 7. Literaturverzeichnis

---

55. Relova AJ, Kampf C, Roomans GM. Effects of Th-2 type cytokines on human airway epithelial cells: interleukins-4, -5, and -13. *Cell Biol Int* 2001; 25(6):563-566.
56. Renauld JC. New insights into the role of cytokines in asthma. *J Clin Pathol* 2001; 54(8):577-589.
57. Rhee CS, Min YG, Lee CH, Kwon TY, Lee CH, Yi WJ et al. Ciliary beat frequency in cultured human nasal epithelial cells. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2001; 110(11):1011-1016.
58. Romagnani S. Cytokines and chemoattractants in allergic inflammation. *Mol Immunol* 2002; 38(12-13):881-885.
59. Rutland J, Griffin W, Cole P. Nasal brushing and measurement of ciliary beat frequency. An in vitro method for evaluating pharmacologic effects on human cilia. *Chest* 1981; 80(6 Suppl):865-867.
60. Rutland J, Dewar A, Cox T, Cole P. Nasal brushing for the study of ciliary ultrastructure. *J Clin Pathol* 1982; 35(3):357-359.
61. Saano V, Nuutinen J, Virta P, Joki S, Karttunen P, Silvasti M. The effect of ATP on the ciliary activity of normal and pathological human respiratory mucosa in vitro. *Acta Otolaryngol* 1991; 111(1):130-134.
62. Satir P, Sleight MA. The physiology of cilia and mucociliary interactions. *Annu Rev Physiol* 1990; 52:137-155.
63. Seybold ZV, Mariassy AT, Stroh D, Kim CS, Gazeroglu H, Wanner A. Mucociliary interaction in vitro: effects of physiological and inflammatory stimuli. *J Appl Physiol* 1990; 68(4):1421-1426.
64. Sun SS, Hsieh JF, Tsai SC, Ho YJ, Kao CH. Evaluation of nasal mucociliary clearance function in allergic rhinitis patients with technetium 99m-labeled

## 7. Literaturverzeichnis

---

- macroaggregated albumin rhinoscintigraphy. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2002; 111(1):77-79.
65. Tarasiuk A, Bar-Shimon M, Gheber L, Korngreen A, Grossman Y, Priel Z. Extracellular ATP induces hyperpolarization and motility stimulation of ciliary cells. *Biophys J* 1995; 68(3):1163-1169.
66. Taube C, Duez C, Cui ZH, Takeda K, Rha YH, Park JW et al. The role of IL-13 in established allergic airway disease. *J Immunol* 2002; 169(11):6482-6489.
67. Terada N, Hamano N, Hohki G, Ikeda T, Sai M, Yamashita T et al. The potential role of interleukin-13 in eosinophilic inflammation in nasal mucosa. *Allergy* 1998; 53(7):690-697.
68. Terada N, Hamano N, Nomura T, Numata T, Hirai K, Nakajima T et al. Interleukin-13 and tumour necrosis factor-alpha synergistically induce eotaxin production in human nasal fibroblasts. *Clin Exp Allergy* 2000; 30(3):348-355.
69. Uzlaner N, Priel Z. Interplay between the NO pathway and elevated  $[Ca^{2+}]_i$  enhances ciliary activity in rabbit trachea. *J Physiol* 1999; 516 ( Pt 1):179-190.
70. van de Donk HJ, Zuidema J, Merkus FW. The influence of the pH and osmotic pressure upon tracheal ciliary beat frequency as determined with a new photo-electric registration device. *Rhinology* 1980; 18(2):93-104.
71. Venkayya R, Lam M, Willkom M, Grunig G, Corry DB, Erle DJ. The Th2 lymphocyte products IL-4 and IL-13 rapidly induce airway hyperresponsiveness through direct effects on resident airway cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002; 26(2):202-208.
72. Walter DM, McIntire JJ, Berry G, McKenzie AN, Donaldson DD, DeKruyff RH et al. Critical role for IL-13 in the development of allergen-induced airway hyperreactivity. *J Immunol* 2001; 167(8):4668-4675.

## 7. Literaturverzeichnis

---

73. Wanner A, Maurer D, Abraham WM, Szepfalusi Z, Sielczak M. Effects of chemical mediators of anaphylaxis on ciliary function. *J Allergy Clin Immunol* 1983; 72(6):663-667.
74. Wanner A, Sielczak M, Mella JF, Abraham WM. Ciliary responsiveness in allergic and nonallergic airways. *J Appl Physiol* 1986; 60(6):1967-1971.
75. Wanner A, Salathe M, O'Riordan TG. Mucociliary clearance in the airways. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154(6 Pt 1):1868-1902.
76. Watt WC, Lazarowski ER, Boucher RC. Cystic fibrosis transmembrane regulator-independent release of ATP. Its implications for the regulation of P2Y2 receptors in airway epithelia. *J Biol Chem* 1998; 273(22):14053-14058.
77. Wills-Karp M. IL-12/IL-13 axis in allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107(1):9-18.
78. Wills-Karp M, Chiamonte M. Interleukin-13 in asthma. *Curr Opin Pulm Med* 2003; 9(1):21-27.
79. Wong LB, Yeates DB. Luminal purinergic regulatory mechanisms of tracheal ciliary beat frequency. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992; 7(4):447-454.
80. Wynn TA. IL-13 effector functions. *Annu Rev Immunol* 2003; 21:425-456.
81. Yoshitsugu M, Rautiainen M, Matsune S, Nuutinen J, Ohyama M. Effect of exogenous ATP on ciliary beat of human ciliated cells studied with differential interference microscope equipped with high speed video. *Acta Otolaryngol* 1993; 113(5):655-659.
82. Zhang L, Sanderson MJ. Oscillations in ciliary beat frequency and intracellular calcium concentration in rabbit tracheal epithelial cells induced by ATP. *J Physiol* 2003; 546(Pt 3):733-749.

## 7. Literaturverzeichnis

---

83. Zhu Z, Homer RJ, Wang Z, Chen Q, Geba GP, Wang J et al. Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. *J Clin Invest* 1999; 103(6):779-788.

### 8. Danksagung

Danken möchte ich Herrn Prof. Dr. R. M. Huber, Leiter der Pneumologie der Medizinischen Klinik Innenstadt der LMU München, für das Überlassen des interessanten Themas und seine freundliche Unterstützung dieser Arbeit.

Ganz besonders bedanken möchte ich bei meinem Betreuer, Herrn Dr. Fernando Gamarra für seine engagierte Hilfe, die Anleitung zur selbständigen Laborarbeit, seine Anregungen und Tipps. Herzlichen Dank auch für Diskussionen über fachliche und weniger fachliche Probleme und die Motivation zur Weiterarbeit an meinem Thema.

Mein Dank gilt auch Dana Krajciova, Kathrin Brückner, Martin Edelmann, Patrick Lingk, Anastassia Marmarowa, Jutta Stief, Merlind Supthut, Ingrid Stocker und allen anderen Doktoranden und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe.

Ebenfalls danken möchte ich allen Patienten, Probanden und Freunden, die mir Proben ihrer Nasenschleimhaut für diese Arbeit zur Verfügung stellten.

Zuletzt möchte ich ganz besonders meiner Familie danken, für ihre Unterstützung und Hilfe nicht nur bei dieser Arbeit.

### 9. Lebenslauf

- Zur Person:** Elisabeth Striegl, geb. Stauß,  
geboren am 09.10.1977 in München  
Erlenweg 10, 85646 Anzing Tel.: 08121/2241960
- Schulbildung:**
- Grundschule: 1984-1988 Grundschule an der Berg-am-Laim-Straße München  
Gymnasium: 1988-1997 Michaeli-Gymnasium München  
Abitur: Mai 1997
- Studium:** 1997-2004 Ludwig-Maximilians-Universität München
- Aug. 1999: Physikum  
Aug. 2000: Erstes Staatsexamen  
Apr. 2003: Zweites Staatsexamen  
Jun. 2004: Drittes Staatsexamen
- Famulaturen:
- Innere Medizin: Klinikum Großhadern  
Gynäkologie: Krankenhaus München Neuperlach  
Dermatologie: Praxis Dr. Ryckmanns München  
Chirurgie: Birmingham Heartlands Hospital, England
- Praktisches Jahr:
- Innere Medizin: Medizinische Klinik Ziemssenstraße, Klinikum Innenstadt LMU  
Chirurgie: Krankenhaus München Neuperlach  
Gynäkologie: Frauenklinik Klinikum Innenstadt LMU
- Beruf:** Jan. 2005 bis Mai 2007 Assistenzärztin im Kreiskrankenhaus  
Pfarrkirchen Abteilung Innere Medizin
- Derzeit:** ab Mai 2007 Mutterschutz bzw. Elternzeit