

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
der Universität Würzburg

Vorstand: Prof. Dr. med. Süleyman Ergün

**Die Rolle des CEACAM1-Moleküls bei der Entstehung von neurogener
Entzündung in den Atemwegen**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Wera Tamara Burow
aus Bergisch Gladbach
Würzburg, Oktober 2019

Referentin: Prof. Dr. med. vet. Gabriela Krasteva-Christ
Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Kai Schuh
Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 17.07.2020

Die Promovendin ist Zahnärztin

Widmung

Meiner Familie

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------------------|---|
| Abb. | Abbildung |
| ACh | Acetylcholin |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BAC | Bakterienchromosom |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| C57BL/6J | Wildtyp-Maus |
| Cart. | Cartilago |
| CC1^{-/-} | Ceacam1-Knockout-Maus |
| CD | Cluster of Differentiation |
| CEACAM1 | Carcinoembryonic Antigen Related Cell Adhesion Molecule 1 |
| CGRP | Calcitonin-Gen-verwandtes Peptid |
| ChAT | Cholinacetyltransferase |
| Cy3 | Indocarbocyanin |
| Cy5 | Indodicarbocyanin |
| DAPI | 4',6 Diaminidin-2-phenylindol |
| Dest. | destilliert |
| eGFP | verstärkt grün-fluoreszierendes Protein |
| EIA | Enzym-Immunoassay |
| eNOS | endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase |
| FITC | Fluoresceinisothiocyanat |
| G-Protein | Guaninnucleotid-bindendes Protein |
| GFP | grün fluoreszierendes Protein |
| GPI | Glykosylphosphatidylinositol |
| GTP | Guanosintriphosphat |
| ICAM | Integrin Superfamilie der Zelladhäsionsmoleküle |
| IgCAMs | Immunglobulin Superfamilie der Zelladhäsionsmoleküle |
| IP3 | Inositol-1,4,5-trisphosphat |
| IP3R3 | IP3-Rezeptor Type 3 |
| Lig. | Ligamentum |

| | |
|--------------------------------|--|
| Ligg. | Ligamenta |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| Ly6G | Leukozyten-Antigen 6 Komplex Region G6D |
| m | monoklonal |
| NHS | normales Pferdeserum |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| p | polyklonal |
| PBS | phosphatgepufferte Salzlösung |
| PFA | Paraformaldehyd |
| PIP2 | Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat |
| PLC | Phospholipase C |
| PLCβ2 | Phospholipase C β 2 |
| PMNs | polymorphonucleäre Leukozyten |
| PP | Phosphatpuffer |
| PSGL-1 | P-Selektin, Glykoprotein Ligand-1 |
| PVP | Polyvinylpyrrolidon |
| RAR | schnell adaptierende Dehnungsrezeptoren |
| SAR | langsam adaptierende Dehnungsrezeptoren |
| SCC | solitäre chemosensorische Zellen |
| SIF | synthetischer interstitieller Flüssigkeit |
| SP | Substanz P |
| Tab. | Tabelle |
| Tas1R | Geschmacks-Rezeptor Type 1 |
| Tas2R | Geschmacks-Rezeptor Type 2 |
| TNF-α | Tumornekrosefaktor- α |
| Tris | (hydroxymethyl)-Aminomethan |
| TRPA1 | transienter Rezeptor-Potenzial-Kationenkanal vom Ankyrin Typ 1 |
| TRPV1 | transienter Rezeptor-Potenzial-Kationenkanal vom Vanilloid Typ 1 |
| TRPM5 | transienter Rezeptor-Potenzial-Kationenkanal der Subfamilie M, Mitglied 5 |

VE-Cadherin vaskulär-endotheliales Cadherin
VEGF vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
VEGFR-2 vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor-Rezeptor-2
WT Wild Typ

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Die Atemwege | 1 |
| 1.2 | Die Bürstenzelle..... | 2 |
| 1.2.1 | Geschmackstransduktion in der Bürstenzelle | 4 |
| 1.2.2 | Der Bitterstoff Cycloheximid als Stimulans für Bürstenzellen | 6 |
| 1.3 | Innervation der Atemwege..... | 6 |
| 1.3.1 | Nicht-adrenerge, nicht-cholinerge Mediatoren | 6 |
| 1.3.2 | Die sensorische Innervation der unteren Atemwege | 7 |
| 1.4 | Die Entzündungsreaktion | 9 |
| 1.4.1 | Vasale Effekte | 9 |
| 1.4.2 | Zelluläre Effekte | 10 |
| 1.4.3 | Neurogene Entzündung | 11 |
| 1.5 | Das Zelladhäsionsmolekül CEACAM1..... | 12 |
| 1.5.1 | CEACAM1 als Pathogenrezeptor | 14 |
| 1.5.2 | Einfluss von CEACAM1 auf die endotheliale Barriere | 15 |
| 1.6 | Ziel der Arbeit | 17 |
| 2 | Material und Methoden | 19 |
| 2.1 | Verwendete Geräte und Chemikalien | 19 |
| 2.2 | Rezepte zur Herstellung der Gebrauchslösungen | 22 |
| 2.3 | Versuchstiere..... | 23 |
| 2.4 | Durchführung der <i>in vivo</i> Versuche | 24 |
| 2.5 | Immunhistochemie..... | 28 |
| 2.5.1 | Gewebeschnitte | 28 |
| 2.5.2 | Whole-Mount Präparate..... | 29 |
| 2.5.3 | Verwendete Antikörper | 30 |
| 2.5.4 | Dokumentation | 31 |
| 2.6 | Versuchsauswertung | 31 |
| 2.7 | Quantifizierung der Granulozytenmigration | 33 |
| 2.8 | Statistik..... | 33 |
| 2.9 | Durchführung der CGRP-Messung..... | 34 |
| 3 | Ergebnisse | 35 |

| | | |
|-------|--|-----------|
| 3.1 | Bürstenzellen im Trachealepithel | 35 |
| 3.2 | Etablierung eines <i>in vivo</i> Versuchsmodells | 36 |
| 3.3 | Einfluss von Atemwegskanüle und Flüssigkeitsapplikation auf die Plasmaextravasation..... | 37 |
| 3.4 | Vergleich der Plasmaextravasation in Trachea und Bronchus..... | 38 |
| 3.5 | Vergleich der basalen Permeabilität bei WT- und CC1 ^{-/-} -Mäusen | 39 |
| 3.6 | CGRP-Freisetzung..... | 41 |
| 3.7 | Plasmaextravasation bei WT- und CC1 ^{-/-} -Mäusen nach Stimulation mit Cycloheximid im mittleren trachealen Abschnitt..... | 41 |
| 3.8 | Plasmaextravasation bei WT- und CC1 ^{-/-} -Mäusen nach Stimulation mit Cycloheximid im bronchialen Abschnitt..... | 43 |
| 3.9 | Quantifizierung der zellulären Immunreaktion | 45 |
| 3.9.1 | Lokalisation der neutrophilen Granulozyten..... | 45 |
| 3.9.2 | Auswirkung von Cycloheximid auf die Migration neutrophiler Granulozyten..... | 47 |
| 4 | Diskussion | 51 |
| 4.1 | Diskussion des Versuchsmodells | 51 |
| 4.1.1 | CC1 ^(-/-) -Mäuse als Modell für eine gestörte endotheliale Barriere und überschießende Immunantwort | 51 |
| 4.1.2 | Untersuchung der endothelialen Barrierefunktion..... | 53 |
| 4.1.3 | Lokalisation und Auswertung der Plasmaextravasation | 54 |
| 4.2 | Plasmaextravasation in den unterschiedlichen Atemwegsabschnitten | 56 |
| 4.3 | Basale Permeabilität bei Endotheldefekt | 57 |
| 4.4 | Provokation einer neurogenen Entzündungsreaktion | 58 |
| 5 | Zusammenfassung | 68 |
| 6 | Literaturverzeichnis | 69 |
| 7 | Tabellenverzeichnis | 80 |
| 8 | Abbildungsverzeichnis | 80 |

1 Einleitung

1.1 Die Atemwege

Die Atemwege werden in obere und untere Atemwege aufgeteilt, wobei die Cavitas nasi sowie der Pharynx zu den oberen und Larynx, Trachea und Pulmones zu den unteren Atemwegen gezählt werden. Die Trachea verbindet den Larynx mit den Bronchi principales und dient zusammen mit dem Bronchialbaum bis zu den Bronchioli terminales der Luftleitung. Ab den Bronchioli respiratorii findet der Gasaustausch statt. Die luftleitenden Atemwege sind mit einem mehrreihigen, hochprismatischen Flimmerepithel ausgekleidet, dem respiratorischen Epithel. Bei Säugetieren sind 32-55% der Trachealepithelzellen zilientragende Flimmerepithelzellen (Pavelka, Ronge, & Stockinger, 1976). Den Rest machen nichtzilientragende Zellen aus. Die sekretorischen Zellen repräsentieren 50-60% der Zellen des respiratorischen Epithels der Maus und sind somit die am häufigsten vorkommenden Vertreter der nichtzilientragenden Zellen (Pack, Al-Ugaily, Morris, & Widdicombe, 1980). Sie sind apikal mit zahlreichen sekretorischen Vesikeln gefüllt, weswegen die Bildung von serösem Sekret als ihre Funktion angenommen wird (Pack et al., 1980). Die Basalzellen bilden 5-10% des respiratorischen Epithels der Maus (Pack et al., 1980). Bei Verletzung oder Verlust des Flimmerepithels sind sie innerhalb kurzer Zeit durch ein verbreiterndes Abflachen in der Lage, die epitheliale Barriere aufrecht zu erhalten (Erjefalt, Sundler, & Persson, 1997). Becherzellen sind einzellige Drüsen, deren Zytoplasma mit Sekretgranula gefüllt ist. Zusammen mit den sekretorischen Zellen und den Glandulae tracheales sind sie für die Schleimproduktion zuständig. Die Schleimbildung sorgt in Kombination mit dem Zilienschlag der Flimmerepithelzellen für einen ständigen Abtransport von Fremdpartikeln und Mikroorganismen in Richtung Rachenraum. Dieser Vorgang wird auch als mukoziliäre Clearance bezeichnet. Neben den bereits genannten Zellen gibt es noch weitere, seltenere Zelltypen wie z.B. Bürstenzellen und neuroendokrine Zellen. Neuroendokrine Zellen sind gekennzeichnet durch eine

Vielzahl elektronendichter Vesikel, deren Funktion noch nicht vollständig charakterisiert ist. Man vermutet, dass sie als Mechanorezeptoren dienen (Lembrechts et al., 2011; Krasteva & Kummer, 2012; Lembrechts et al., 2012). Diese Arbeit beschäftigt sich vor allem mit der Bürstenzelle, weswegen lediglich auf diese im nächsten Kapitel näher eingegangen wird. Die Trachea von Mäusen besitzt einen Durchmesser von 1,5 mm. Knorpelspannen kommen nur in den extrapulmonalen Atemwegen vor, während beim Menschen Knorpelspannen auch in der Lunge zu finden sind. Auch submuköse Drüsen existieren bei der Maus nur in der proximalen Trachea, beim Menschen kommen sie auch tief in der Lunge vor (Rock, Randell, & Hogan, 2010). Die beim Menschen im Tracheal- und Bronchialepithel häufig vorkommenden Becherzellen nehmen zu den Bronchioli hin ab. Bei Mäusen sind Becherzellen eher selten, dafür kommen Keulenzellen bereits in den oberen Atemwegen vor. Beim Menschen sind Keulenzellen erst in den tiefen Atemwegen anzutreffen (Pavelka et al., 1976; Pack et al., 1980; Rock et al., 2010). Auch hinsichtlich der Epithelbeschaffenheit unterscheiden sich einzelne Abschnitte der Atemwege beim Mensch und bei der Maus: Beim Menschen sind die terminalen Bronchiolen bis zu einem Durchmesser von 0,5 mm von einem mehrreihigen Epithel bedeckt. Nur die Bronchioli respiratorii sind mit einem einschichtigen kubischen Epithel ausgekleidet. Bei der Maus kommt das mehrreihige Epithel ausschließlich in der Trachea vor. Der Übergang zum einschichtigen kubischen Epithel findet in den Hauptbronchien statt. Somit repräsentieren die intrapulmonalen Abschnitte der Maus lediglich die am weitesten distal gelegenen Abschnitte der menschlichen luftleitenden Atemwege. Die Maustrachea spiegelt den größten Teil der menschlichen Atemwegsabschnitte einschließlich der Lunge wieder (Rock et al., 2010).

1.2 Die Bürstenzelle

Bürstenzellen, die in der Nase auch als solitäre chemosensorische Zellen (SCCs) und im Darm als Tuft-Zellen bezeichnet werden, sind differenzierte Epithelzellen. Durch Rhodin und Dalhamn wurden Bürstenzellen 1956 erstmals in der

trachealen Mukosa von Ratten entdeckt (Rhodin & Dalhamn, 1956). Über die genaue Terminologie dieser Zellen herrscht bisher keine Einigkeit, da sie einerseits durch die der bürsten- bzw. büschelförmigen apikalen Oberflächendifferenzierung charakterisiert werden, jedoch auch ihre chemosensorische Funktion als für die Namensgebung bedeutendes Kriterium angesehen wird (Sbarbati & Osculati, 2005). Ihre apikale Oberfläche wird von besonders langen Mikrovilli gebildet, deren Aktinfilamente bis weit ins Zytoplasma reichen (Hofer & Drenckhahn, 1992). Des Weiteren ist eine ausgeprägte Birnenform mit einer breiten Basis und einem schmalen Apex charakteristisch für diese Zellen (Pavelka & Roth, 2005; Reid et al., 2005). Bisher wurden Bürstenzellen in den Epithelien von Magen, Darm, Gallenblase, Gallenwegen (Schutz et al., 2015), Pankreasgang (Hofer & Drenckhahn, 1998), Urethra (Deckmann et al., 2014), Tuba auditiva (Krasteva et al., 2012a), Nase (Zancanaro, Caretta, Merigo, Cavaggioni, & Osculati, 1999; Finger et al., 2003), vomeronasalem Organ (Zancanaro et al., 1999; Finger et al., 2003), Larynx (Rhodin & Dalhamn, 1956; Sbarbati et al., 2004), Trachealdrüsen (Krasteva-Christ et al., 2015), Konjunktiva (Wiederhold et al., 2015), Thymus (Panneck et al., 2014) und Trachea (Rhodin & Dalhamn, 1956) nachgewiesen. Lediglich bei der Ratte wurden Bürstenzellen in den Bronchiolen und Alveolen der Lunge gefunden (Meyrick & Reid, 1968; Krasteva et al., 2011; Tizzano, Cristofolletti, Sbarbati, & Finger, 2011). In der Trachea von Mäusen konnten Bürstenzellen in einer Dichte von 40-50 pro 100 μm^2 nachgewiesen werden (Krasteva et al., 2011; Saunders, Christensen, Finger, & Tizzano, 2014). Wobei doppelt so viele Zellen zwischen den Knorpelspannen lokalisiert waren wie im knorpelbedeckenden Epithel. Das den Trachealmuskel bedeckende Epithel ist praktisch frei von Bürstenzellen (Krasteva et al., 2011; Tizzano et al., 2011). Die Dichte der Bürstenzellen nimmt in den Hauptbronchien ab. In der Lunge wurden sie vereinzelt in den Bronchiolen mit einem Durchmesser über $400 \pm 100 \mu\text{m}$ gefunden. In kleineren Bronchiolen und den Alveolen konnten keine Bürstenzellen nachgewiesen werden (Tizzano et al., 2011). Die Funktion dieser besonderen Zellen ist immer noch nicht vollständig geklärt. Allein ihre Morphologie lässt jedoch Funktionen wie z.B. Chemorezeption, die Regulation

der Elektrolytkonzentration von Sekreten, Absorption oder Regeneration vermuten (Reid et al., 2005). Durch ihren Kontakt mit Nervenfasern wurde schon früh eine sensorische Funktion vermutet (Rhodin & Dalhamn, 1956).

1.2.1 Geschmackstransduktion in der Bürstenzelle

Es gibt 5 Geschmacksrichtungen: salzig, sauer, süß, umami und bitter. Die Geschmacksqualitäten salzig und sauer werden über Ionenkanäle wahrgenommen (Schild, 2010). Die anderen Geschmacksrichtungen werden durch Mitglieder der Geschmacksrezeptorfamilie 1 oder 2 erkannt (Tas1R, Tas2R). Die Geschmäcker süß und umami werden durch den Tas1R und bitterer Geschmack durch den Tas2R detektiert (Hoon et al., 1999; Chandrashekar et al., 2000). Von einem Signalweg zur Wahrnehmung vom Geschmack in den Atemwegen wurde erstmals von Zancanaro und Kollegen 1999 berichtet (Zancanaro et al., 1999). Bürstenzellen exprimieren die komplette klassische Geschmackstransduktionskaskade für bitter und süß, die aus der Geschmacksknospe bekannt ist (Hoon et al., 1999). Die Geschmacksrezeptoren sind an G-Proteine gekoppelt, von denen ein bekannter Vertreter das α -Gustducin ist (Finger & Kinnamon, 2011). Die weitere Signaltransduktion erfolgt über die Phospholipase C β 2 (PLC β 2), die zur Freisetzung des sekundären Botenstoffs Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP3) führt. IP3 bewirkt über Bindung an den IP3-Rezeptor Type 3 (IP3R3) eine Erhöhung der intrazellulären Kalzium-Ionenkonzentration, wodurch sich der transiente Rezeptor-Potenzial-Kationenkanal M5 (TRPM5) öffnet und ein Natrium-Einstrom zur Depolarisation der Plasmamembran führt (Finger & Kinnamon, 2011; Kinnamon, 2012). Es wird angenommen, dass der intrazelluläre Kalziumanstieg in der Geschmacksknospe zur Neurotransmitterfreisetzung führt, die sensorische Nervenfasern in der Umgebung aktivieren. Tracheale Bürstenzellen sind positiv für die Cholinacetyltransferase (ChAT), ein Enzym, das den Neurotransmitter Acetylcholin (ACh) synthetisiert und in cholinergen Nervenzellen vorkommt (Krasteva et al., 2011). Zudem werden 5,8% der Trachealbürstenzellen von intraepithelialen CGRP (calcitonin gene-related-peptide)-positiven Nervenfasern

kontaktiert (Krasteva et al., 2011). In der Nase von Mäusen wurden häufiger Kontakte zwischen chemosensorischen TRPM5-positiven bzw. α -Gustducin-positiven Zellen und CGRP-positiven Nervenfasern gefunden (Tizzano et al., 2011). Es wurden sogar synaptische Kontakte zwischen chemosensorischen Zellen und trigeminalen afferenten Nervenfasern im nasalen Epithel von Mäusen und Ratten beschrieben (Finger et al., 2003). Nervenfasern, die nasale Bürstenzellen kontaktieren, sind sowohl für CGRP als auch für Substanz P (SP) positiv (Tizzano et al., 2010; Saunders et al., 2014). Im nasalen Epithel von Mäusen konnte indirekt gezeigt werden, dass es nach Aktivierung der Geschmackskaskade zur Ausschüttung von ACh aus Bürstenzellen kommt. ACh stimuliert die Freisetzung vom proinflammatorischen Neuropeptid SP aus trigeminalen Nervenfasern, welches zu einer lokalen neurogenen Entzündungsreaktion des nasalen Epithels führt (Saunders et al., 2014). Durch die Induktion der Geschmackskaskade kommt es in der Trachea zudem zu einer Drosselung der Atmung (Krasteva et al., 2011) und in der Nase zu einer Apnoe (Chandrashekar et al., 2000; Finger et al., 2003). Eingeatmete Fremdkörper, bakterielle Bitterstoffe, freie Aminosäuren bei entzündungsbedingtem Proteinabbau sowie Magensäure bei gastroösophagealem Reflux führen zu einem wahrnehmbaren Geschmack. Es wird angenommen, dass auch eine Reihe von bakteriellen Bitterstoffen und freien Aminosäuren die Geschmackstransduktionskaskade aktivieren können (Krasteva, Canning, Papadakis, & Kummer, 2012b). Diese gustatorische Wahrnehmung könnte von enormem Vorteil bei der frühzeitigen Erkennung von Pathogenen sein (Merigo, Benati, Tizzano, Osculati, & Sbarbati, 2005; Kaske et al., 2007; Krasteva & Kummer, 2012; Saunders, Reynolds, & Finger, 2013). Bürstenzellen stellen in den verschiedenen Körperregionen individuelle Gruppen dar, die sich in vielerlei Hinsicht unterscheiden, deren gemeinsame Aufgabe jedoch die Überwachung der mukösen Oberfläche sein könnte (Krasteva & Kummer, 2012). Die Expression der Geschmackskaskade in so vielen Geweben des Körpers deutet auf eine entscheidende Funktion dieser Zellen hin, die noch lange nicht für alle Organe verstanden ist (Finger & Kinnamon, 2011).

1.2.2 Der Bitterstoff Cycloheximid als Stimulans für Bürstenzellen

Cycloheximid ist ein Antibiotikum, das vom Bodenbakterium *Streptomyces griseus* gebildet wird. Es wirkt als Translationshemmer bakteriostatisch auf eukaryotische Zellen (Obrig, Culp, McKeehan, & Hardesty, 1971). Cycloheximid ist ein spezifischer Ligand für den Rezeptor Tas2R105. Lossow et al. (2016) haben 128 Bittersubstanzen an 34 verschiedenen Rezeptoren der Tas2R-Familie getestet. 45 dieser Substanzen sind mögliche Agonisten des Tas2R105. Cycloheximid scheint nur spezifisch an den Tas2R105 zu binden. Der Schwellenwert zur Tas2R105-Aktivierung liegt für Cycloheximid bei 10 nM und ist damit der niedrigste aller ermittelten Schwellenwerte. Cycloheximid scheint also eine besonders hohe Potenz am Tas2R105 Rezeptor zu besitzen (Chandrashekar et al., 2000; Lossow et al., 2016). Nach Krasteva und Kummer (2012) übersichtlich zusammengefasst, ist der Tas2R105 im respiratorischen Epithel der Nase (Finger et al., 2003; Tizzano et al., 2010), im vomeronasalen Organ (Ogura, Krosnowski, Zhang, Bekkerman, & Lin, 2010), in der Tuba auditiva (Krasteva et al., 2012a), im Larynx sowie in der Trachea und den Bronchien (Tizzano et al., 2011) von Mäusen zu finden (Krasteva & Kummer, 2012). Die intranasale und intratracheale Stimulation mit Cycloheximid aktiviert trigeminale sowie vagale Nervenfasern und führt zu einer Veränderung der Atemfrequenz (Chandrashekar et al., 2000; Finger et al., 2003; Krasteva et al., 2011).

1.3 Innervation der Atemwege

1.3.1 Nicht-adrenerge, nicht-cholinerge Mediatoren

Neben der adrenergen und cholinergen Innervation der Atemwege findet sich ein weiteres System: das nicht-adrenerge und nicht-cholinerge System. Neuropeptide wie CGRP und SP stellen wichtige Mediatoren in diesem System dar. CGRP-positive Neurone kommen im zentralen wie auch im peripheren Nervensystem vor. In der Peripherie sind CGRP-positive Nervenfasern häufig assoziiert mit glatter Gefäßmuskulatur (Rosenfeld et al., 1983; Brain, Tippins,

Morris, MacIntyre, & Williams, 1986). Das Neuropeptid wird heute als einer der potentesten Vasodilatoren angesehen (Brain et al., 1986; Iyengar, Ossipov, & Johnson, 2017), auf dessen Wirkung das Erythem bei einer Entzündungsreaktion zurückgeht (Brain et al., 1986). Zusätzlich wird ihm eine Bedeutung in der Somatosensorik zugesprochen (Iyengar et al., 2017). Auch das Neuropeptid SP, welches zur Familie der Neurokinine gehört, führt bei seiner Freisetzung aus freien Nervenendigungen zu einer Vasodilatation (Pernow, 1983). Zudem bewirkt es eine Erhöhung der Gefäßpermeabilität mit verstärkter Plasmaextravasation in postkapillären Venolen (Kenins, Hurley, & Bell, 1984; Holzer, 1992). Es wird angenommen, dass in den Atemwegen CGRP-positive Nervenfasern auch positiv für SP sind (Martling, Saria, Fischer, Hokfelt, & Lundberg, 1988). Kestell et. al. (2015) konnten jedoch auch CGRP-positive und SP-negative Fasern in der Haut von Vorderpfote, in Spinalganglien und im Rückenmark von Mäusen nachweisen. Die beiden Neuropeptide kommen also nicht zwingend zusammen vor und werden daher vermutlich auch nicht immer gemeinsam ausgeschüttet (Kestell, Anderson, Clarke, Haberberger, & Gibbins, 2015).

1.3.2 Die sensorische Innervation der unteren Atemwege

Die sensorischen (speziell-somatosensibel) und sensiblen (allgemein-somatosensibel) Fasern, die die Atemwege versorgen, verlaufen größtenteils mit dem Nervus vagus. Es sind pseudounipolare Nervenfasern, deren Perikaryen im Ganglion jugulare und Ganglion nodosum liegen. Einige Fasern ziehen zusammen mit sympathischen Axonen durch die Grenzstrangganglien ins Hinterhorn des Rückenmarks, ihre Perikaryen liegen in den Spinalganglien (Kummer, Fischer, Kurkowski, & Heym, 1992). Bei der sensiblen bzw. sensorischen Innervation werden myelinisierte A-Fasern mit einer schnellen Leitungsgeschwindigkeit von unmyelinisierten, langsamer leitenden C-Fasern unterschieden (J. C. Coleridge & Coleridge, 1984; Sant'Ambrogio, 1987; H. M. Coleridge & Coleridge, 1994; Ricco, Kummer, Biglari, Myers, & Udem, 1996). Mechanische Einwirkungen und Noxen werden in den Atemwegen von langsam und schnell adaptierenden Dehnungsrezeptoren sowie bronchialen und

pulmonalen C-Fasern wahrgenommen (J. G. Widdicombe, 1954a; Karlsson, Sant'Ambrogio, & Widdicombe, 1988; Stretton, 1991; Davies & Moores, 2010). Die langsam adaptierenden Dehnungsrezeptoren (SAR) befinden sich in der glatten Muskulatur der großen luftleitenden Atemwege (Stretton, 1991) sowie in den intrapulmonalen Atemwegen und der Lunge (Yu, Wang, & Zhang, 2003; Canning et al., 2014). Sie regulieren und kontrollieren die Atmung durch Überwachung des Bronchialmuskeltonus (J. G. Widdicombe, 1954). Zudem scheinen sie an der Auslösung des Hering-Breuer-Reflexes, der die Lunge vor Überdehnung schützt, beteiligt zu sein (H. M. C. Coleridge, J. C. G., 1986; Canning et al., 2014). Schnell adaptierende Dehnungsrezeptoren (RAR) werden auch als Irritationsrezeptoren bezeichnet (Davies & Moores, 2010; Fillenz & Widdicombe, 1972). Sie stehen in Kontakt mit dem respiratorischen Epithel und leiten ihre Aktionspotentiale über myelinisierte A δ -Fasern (Hunter & Udem, 1999; J. Widdicombe, 2003). Sie können durch mechanische und chemische Stimuli erregt werden, wobei die mechanische Sensibilität in den proximalen Bronchien und die chemische in den distalen Bronchien stärker ausgeprägt ist (J. Widdicombe, 2003). RAR sind in Trachea und proximalen Bronchien für das Auslösen von Husten verantwortlich. In der Lunge verursachen sie Hyperpnoe, eine vertiefte Atmung und Husten (Stretton, 1991; Fillenz & Widdicombe, 1972). C-Fasern sind nicht-myelinisiert und haben daher eine geringere Leitungsgeschwindigkeit. Die Nervenendigungen der bronchialen C-Fasern liegen im respiratorischen Epithel, die der pulmonalen C-Fasern im Lungenparenchym (J. C. Coleridge & Coleridge, 1984; H. M. Coleridge & Coleridge, 1994). C-Fasern können durch verschiedene exogene Faktoren wie Capsaicin, ein extrem scharfes Alkaloid der Chili, oder Zigarettenrauch (Kichko, Kobal, & Reeh, 2015) stimuliert werden. Aber auch endogen durch Histamin, Prostaglandin oder Bradykinin (H. M. C. Coleridge, J. C. G., 1986; Stretton, 1991). Ihre Sensitivität für Capsaicin ist charakteristisch, weswegen sie auch häufig als „Capsaicin-sensitive Fasern“ bezeichnet werden. Die Stimulation bronchialer und pulmonaler C-Fasern führt zu Bradykardie, Husten und verminderter Atemaktivität bis hin zur Apnoe. Am Auslösen von Husten sind auf C-Fasern vorhandene transiente Rezeptor-Potenzial-Kationenkanäle vom

Ankyrin Typ 1 (TRPA1) und Vanilloid Typ 1 (TRPV1) beteiligt (Canning et al., 2014). Durch die Freisetzung von Neuropeptiden kann die Stimulation von C-Fasern zudem eine Bronchokonstriktion, erhöhte Schleimproduktion und Plasmaextravasation auslösen (H. M. Coleridge & Coleridge, 1994). Die Neuropeptide spielen zudem bei der Entstehung der neurogenen Entzündung eine wichtige Rolle (Lundberg, Hokfelt, Martling, Saria, & Cuello, 1984), worauf im folgenden Kapitel näher eingegangen wird. Das durch die Reizung der verschiedenen Rezeptoren ausgelöste Signal wird zunächst orthodrom entlang der myelinisierten A oder der unmyelinisierten C-Fasern in Richtung des Perikaryons geleitet (Herbert & Holzer, 2002). Dabei kommt es über Axonkollaterale auch zu einer antidromen Leitung mit netzförmiger Ausbreitung entlang des Innervationsgebietes der erregten Nervenfasern, was man auch als einen „Axonreflex“ oder antidrome Leitung bezeichnet. Im Zuge dieser Erregung werden aus den freien Nervenendigungen der C-Fasern Neuropeptide ausgeschüttet (Bayliss, 1901; A. Ninian Bruce, 1910; A. Ninian Bruce, 1913; Holzer, 1992; Herbert & Holzer, 2002). Ein solcher Axonreflex führt klinisch zu einer schnell auftretenden Rötung innerhalb des Innervationsgebietes (Lewis, 1926).

1.4 Die Entzündungsreaktion

Eine Entzündungsreaktion wird über fünf Kardinalsymptome definiert: Rubor (Rötung), Calor (Erwärmung), Tumor (Schwellung), Dolor (Schmerz) und Functio laesa (Funktionseinschränkung), die neben anderen Faktoren durch vasale sowie zelluläre Effekte ausgelöst werden (Libby, 2007).

1.4.1 Vasale Effekte

Im Zuge der Entzündungsreaktion treten drei vasale Effekte auf: erhöhter Blutfluss, erhöhte Gefäßpermeabilität sowie eine Vasodilatation (Wilhelm, 1973; Nidavani, Mahalakshmi, & Shalawadi, 2014). Die Gefäßpermeabilität beschreibt ein Gleichgewicht zwischen Durchlässigkeit und Barrierefunktion, die als

Eigenschaft des Endothels für seine physiologische Funktion unerlässlich ist. Sie ist selektiv und definiert dadurch, was und welche Bestandteile des Blutes samt seiner gelösten Bestandteile aus dem Lumen des Gefäßes in das umgebende Interstitium gelangen können. Eine Störung dieses Gleichgewichts spielt in der Pathophysiologie akuter und chronischer Entzündungen eine zentrale Rolle (Nidavani et al., 2014). Je nach Gefäßtyp variiert auch die Permeabilität. Sie nimmt zu den Kapillaren hin zu, wofür der Aufbau und die Charakteristika der Gefäßwand wie Zell-Zell-Kontakte zwischen den Endothelzellen verantwortlich sind. Unter normalen Bedingungen ist das Endothel für Salze und kleine Moleküle unter 70 kDa durchlässig. Diese können spontan austreten (Egawa et al., 2013), während größere Moleküle, wie z.B. Immunzellen, zum Verlassen des Gefäßes eine beispielsweise durch Entzündungsmediatoren bedingte Auflockerung der endothelialen Barriere benötigen (Majno, Shea, & Leventhal, 1969). Diese erhöhte Permeabilität ist vor allem in postkapillären Venolen zu finden (Majno, Palade, & Schoefl, 1961; Joris, Majno, Corey, & Lewis, 1987), kann aber auch in Kapillaren und größeren Venolen stattfinden (Roberts & Palade, 1995).

1.4.2 Zelluläre Effekte

Neben den vasalen Effekten kommt es zur Einwanderung von Entzündungszellen (Nidavani et al., 2014). Leukozyten gehören zu den Vertretern des Immunsystems, die als Erstes am Entzündungsherd auftauchen. Sie sind dadurch ein wichtiger Marker für akutes Entzündungsgeschehen (Borregaard, 2010). Neutrophile Granulozyten, die ihren Namen durch ihre gute Anfärbbarkeit mit neutralem Farbstoff erhielten (Ehrlich, 1880), sind spezialisierte Immunzellen, die mit einem Anteil von 50-65% den größten Teil der Leukozyten ausmachen. Charakterisiert durch einen polymorphen Kern (Ehrlich, 1880) werden sie auch polymorphonukleäre Leukozyten oder (PMNs) genannt. Als Teil der angeborenen Immunabwehr spielen sie eine Schlüsselrolle bei der Identifizierung und Bekämpfung von Pathogenen. Sie modulieren die Immunantwort und sind gleichzeitig für die Destruktion und Regeneration von

Gewebe verantwortlich (Nathan, 2006). Neutrophile Granulozyten patrouillieren nach ihrer Reifung im Knochenmark nur 6-8 Stunden im Blut (Amulic, Cazalet, Hayes, Metzler, & Zychlinsky, 2012). Die zirkulierenden neutrophilen Granulozyten suchen die Gefäßwände kontinuierlich nach Adhäsionsmolekülen wie P-Selektin, E-Selektin und Mitgliedern der Integrin-Superfamilie für Zelladhäsionsmoleküle (ICAM) ab (Lawrence, Kansas, Kunkel, & Ley, 1997; Borregaard, 2010; Amulic et al., 2012). Bei Bindung öffnen sich die Kontakte zwischen den einzelnen Endothelzellen, sodass eine parazelluläre Migration stattfinden kann (Borregaard, 2010). Sie verlassen die Blutgefäße, um geleitet von Chemokinen, bis an den Erregerherd heranzuwandern. Das Erreichen der Erreger erfordert somit meist eine Gewebsdestruktion, die die lokale Entzündungsreaktion verstärkt, jedoch im Zuge der Infektabwehr unvermeidbar ist (Crockett-Torabi & Ward, 1996). Um die Bindung an die Rezeptoren der Gefäßwand zu ermöglichen, exprimieren neutrophile Granulozyten verschiedene Oberflächenproteine, wie den P-Selektin, Glykoprotein Ligand-1 (PSGL-1) und L-Selektin. Ein weiteres Protein auf der Oberfläche der neutrophilen Granulozyten ist das Ly6G Protein (Lymphocyte antigen 6 complex locus G6D). Es ist ein Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-gekoppeltes Antigen, das als Oberflächenmarker von Immunzellen und als Ziel zur Antikörperanlagerung dient. Die genaue Funktion des Oberflächenproteins ist noch nicht abschließend geklärt, es scheint eine Rolle bei der Migration der neutrophilen Granulozyten zu spielen (Lee, Wang, Parisini, Dascher, & Nigrovic, 2013).

1.4.3 Neurogene Entzündung

Als neurogene Entzündung bezeichnet man eine Entzündungsreaktion, die durch die Aktivierung sensorischer Nervenendigungen ausgelöst wird (Herbert & Holzer, 2002). Erstmals beschrieben wurde diese Form der Entzündungsreaktion 1926 durch T. Lewis, als eine sich in der Umgebung des Reizes ausdehnende Rötung, begleitet von einem Ödem (Lewis, 1926; Kong, 1960). Die häufig verwendeten Begriffe „Axonreflex“ und „antidrome Vasodilatation“ (Lewis, 1926) stellen die Gefäßweitstellung in den Mittelpunkt, während Jancsó den Begriff

neurogene Entzündung mit Blick auf eine erhöhte Gefäßpermeabilität und Extravasation in Abgrenzung zum Axonreflex prägte (Jancsó, 1960; Jancsó, Jancsó-Gabor, & Szolcsanyi, 1967). Heute wird der Begriff neurogene Entzündung als Überbegriff verwendet, der sowohl eine Vasodilatation als auch die gesteigerte Gefäßpermeabilität beschreibt (Herbert & Holzer, 2002). Eine neurogene Entzündung kann durch Noxen verschiedenster Art ausgelöst werden, die auf die Haut, Schleimhaut, Gelenkkapsel oder andere Gewebe einwirken (Holzer, 1992). Da Schmerz und Noxen wahrnehmende nozizeptive Afferenzen in jedem Gewebe vorkommen, kann eine neurogene Entzündungsreaktion praktisch am gesamten Körper auftreten (Herbert & Holzer, 2002).

1.5 Das Zelladhäsionsmolekül CEACAM1

Zelladhäsionsmoleküle werden in vier Gruppen unterteilt: Cadherine, Integrine, Selektine und die Immunglobulin-Superfamilie. Wie bereits aus ihrem Namen abzuleiten ist, spielen Zelladhäsionsmoleküle eine Rolle bei Zell-Zell- aber auch bei Zell-Matrix-Interaktionen. Somit sind sie für die Bildung und Aufrechterhaltung der Gewebefunktion und der dreidimensionalen Gewebestruktur nicht nur in Embryogenese und Wundheilung, sondern auch bei immunologischen Funktionen und Entzündungsreaktionen verantwortlich (Aplin, Howe, Alahari, & Juliano, 1998). Die Immunglobulin-Superfamilie der Zelladhäsionsmoleküle (IgCAMs) fasst eine Gruppe von Oberflächen- und löslichen Proteinen zusammen (Lander et al., 2001). Ihre Expression kann durch Zytokine, wie den Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), das Interleukin-1 und das Interferon- γ induziert werden, was einen Zusammenhang mit Entzündung und Tumorgenese vermuten lässt (Makrilia, Kollias, Manolopoulos, & Syrigos, 2009). Eine Untergruppe der IgCAMs bilden die „carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules“ (CEACAMs) (Beauchemin et al., 1999), zu denen auch CEACAM1 gehört. Es sind Immunglobulin-ähnliche Glykoproteine, die bei Säugetieren vorkommen (Kuespert, Pils, & Hauck, 2006). Der Name „carcinoembryonic“ rührt von der Erstbeschreibung als onkofetales Antigen her. Die Erstbeschreiber Gold und

Freedman gingen 1965 davon aus, dass diese Antigene nur im Embryo oder bei tumorranken Erwachsenen exprimiert werden (Gold & Freedman, 1965). Heute ist bekannt, dass CEACAMs auch beim gesunden Erwachsenen von Zellen in verschiedensten Geweben wie z.B. dem Epithel des Gastrointestinaltrakts, des Nasopharynx, der Lunge und des Urogenitaltrakts exprimiert werden sowie in ekkrinen Schweißdrüsen (Thompson, 1995; Kuespert et al., 2006). Auch auf dem Endothel und den Zellen des Immunsystems werden CEACAMs exprimiert (Prall et al., 1996; Rueckschloss, Kuerten, & Ergun, 2016). CEACAMs beeinflussen zelluläre Prozesse wie Gewebeaufbau, Gefäßausprossung im Rahmen der Angiogenese (Ergun et al., 2000) und die Neubildung von Lymphgefäßen (Kilic et al., 2007). Auch bei der Blutzuckerregulation und T-Zell Proliferation spielen CEACAMs eine Rolle (Kuespert et al., 2006). Alle CEACAM-Moleküle besitzen N-Terminal, eine Immunglobulin-artige variable Region, die auch als IgV-artige Domäne bezeichnet wird. Membranwärts folgen null bis sechs IgC2-artige Domänen, deren Sekundärstruktur homolog zu der der IgV-Domäne ist. Die unterschiedliche Anzahl von IgC2-artigen Domänen und das variierende Ausmaß der Glykosylierung sind für den deutlichen Größenunterschied zwischen den CEACAM-Molekülen verantwortlich (Thompson, Grunert, & Zimmermann, 1991; Gray-Owen & Blumberg, 2006). Ein nicht-glykosylierter Bereich in der N-terminalen IgV-artigen Domäne vermittelt homophile interzelluläre Bindungen und ist Bindungsstelle von verschiedenen bakteriellen und viralen Adhäsinen (Gray-Owen & Blumberg, 2006).

CEACAM1

CEACAM1 wurde 1965 von Gold und Freedman erstmals als tumorspezifisches Antigen in Kolangewebe beschrieben. Es war früher auch unter den Synonymen „biliary glycoprotein“ (BGP) und CD66a beim Menschen sowie als C-CAM bei Ratten bekannt (Gold & Freedman, 1965; Obrink, 1997; Beauchemin et al., 1999). CEACAM1 besitzt in seiner Familie das breiteste Expressionsspektrum und ist in Epithel, Endothel und auf Zellen der myeloischen Reihe zu finden (Prall et al., 1996). Seine Expression ist zusätzlich induzierbar auf Endothelzellen und

T-Zellen (Kuespert et al., 2006). Prall et al. konnten CEACAM1 im Gewebe von Ösophagus, Leber, Gallenblase, Pankreas, Niere, Prostata, Endometrium und Mamma nachweisen sowie eine Ähnlichkeit der Expression bei Mensch und Ratte aufzeigen (Prall et al., 1996). CEACAM1 wird von Endothelzellen der Ratte (Sawa et al., 1994) und auf ortsständigen vaskulären Vorläuferzellen sowie endothelialen und myeloischen Zellen der Maus exprimiert (Godfraind et al., 1995). Unter physiologischen Bedingungen ist CEACAM1 im Endothel der Erwachsenenblutgefäße kaum nachweisbar, wird jedoch hochreguliert, sobald die Blutgefäße durch Tumor oder Entzündungsprozesse aktiviert werden (Oliveira-Ferrer et al., 2004; Kilic et al., 2005; Tilki et al., 2006). Es konnte gezeigt werden, dass die endotheliale Hochregulation von CEACAM1 die Migration und Proliferation sowie die Kapillarformation der Endothelzellen steigert und somit proangiogenetisch wirkt (Ergun et al., 2000; Kilic et al., 2005). Es ist ein transmembranöses Glykoprotein, das beim Menschen in mindestens 11 verschiedenen Splice-Varianten vorkommt (Kuroki et al., 1991; Barnett, Drake, & Pickle, 1993). Die CEACAM1 Splice-Varianten unterscheiden sich nicht nur in der Anzahl ihrer IgC2-ähnlichen Domänen, sondern auch in ihren transmembranösen Domänen und der Länge der zytoplasmatischen Domäne (Gray-Owen & Blumberg, 2006).

1.5.1 CEACAM1 als Pathogenrezeptor

Das CEACAM1-Molekül ist an Signaltransduktion, Angiogenese und Tumorgenese beteiligt. Als Pathogenrezeptor dient es beim Menschen als Angriffspunkt für eine Vielzahl gramnegativer Bakterien der nasopharyngealen, intestinalen und urogenitalen Mukosa. Insbesondere die Bakterien *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Moraxella catarrhalis* und *Haemophilus influenzae* verfügen über Adhäsine, wie Opacity-Proteine, um beim Menschen an CEACAM-Moleküle binden zu können (Sauter, Rutherford, Wagener, Shively, & Hefta, 1993; Voges, Bachmann, Kammerer, Gophna, & Hauck, 2010). *Neisseria meningitidis* und *Moraxella catarrhalis* sind im humanen Bronchialepithel in der Lage, durch Tyrosin-Phosphorylierung des CEACAM1,

ein inhibitorisches Potenzial auszulösen, welches über eine komplexe Kaskade die Expression proinflammatorischer Gene unterdrückt. So können die Bakterien durch Bindung an CEACAM1 das Immunsystem unterdrücken und erfolgreicher die Mukosa kolonisieren (Slevogt et al., 2008). Die Bindung dieser Bakterienstämme an CEACAM1 ist speziesspezifisch und wurde bei der Maus nicht nachgewiesen (Voges et al., 2010). Bei Mäusen erfolgt die Bindung des Hepatitis Virus MHV-A59 an das CEACAM1-Molekül (Dveksler et al., 1993), was CEACAM1-defiziente Mäuse resistent gegenüber diesem Virus macht (Hemmila et al., 2004).

1.5.2 Einfluss von CEACAM1 auf die endotheliale Barriere

Im Gegensatz zu den oben genannten Funktionen von CEACAM1 ist über seine Rolle in der Homeostase noch wenig bekannt. Endotheliale Zell-Zell-Kontakte gewährleisten den Zusammenhalt von Endothelzellen und ihre Polarität. Ein Verlust dieser Kontakte führt zur Spaltbildung im Endothel mit einer Erhöhung der endothelialen Permeabilität für Blutbestandteile, wie Albumin oder Leukozyten. Eine besonders wichtige Rolle bei der Verbindung von Endothelzellen spielt das Zelladhäsionsmolekül „vascular endothelial cadherin“ (VE-Cadherin) (Giannotta, Trani, & Dejana, 2013). VE-Cadherin hat über einen Komplex aus β -Catenin bzw. Plakoglobin und α -Catenin Kontakt zu Aktin-Mikrofilamenten. Außerdem ist es über Plakoglobin bzw. Plaktophilin-4 an Desmoplakin gebunden, welches wiederum die Verbindung zu Intermediärfilamenten herstellt. Über diese Verbindungen erhält VE-Cadherin Anbindung an das Zytoskelett der Endothelzelle (Vincent, Xiao, Buckley, & Kowalczyk, 2004). Die endotheliale Permeabilität wird über eine kalziumabhängige Aktivität kleiner GTPasen aus der Rho-Familie reguliert sowie über die Phosphorylierung des Cadherin-Catenin-Komplexes (Vestweber, 2008). Durch Tyrosin-Phosphorylierung von VE-Cadherin und β -Catenin kommt es zu einem Zerfall des Adhärenskomplexes, was die endotheliale Barriere schwächt (Giannotta et al., 2013). Tight Junctions sind eine weitere Form von Zell-Zell-Kontakten, die bei der Aufrechterhaltung der endothelialen Barrierefunktion eine

Rolle spielen. VE-Cadherin kontrolliert die Expression des Claudin-5 Proteins, einem Bestandteil der Tight Junctions (Gavard & Gutkind, 2008). CEACAM1 scheint in vielerlei Hinsicht Einfluss auf die Homöostase zu nehmen (Najjar et al., 2013). CEACAM1-Deletion geht mit einer *in vivo* und *in vitro* gesteigerten Gefäßpermeabilität einher (Nouvion et al., 2010). Es hat durch Interaktion mit Cadherin-Catenin-Komplexen Einfluss auf die initiale Bildung von Adhärenskontakten und die Regulierung ihrer Stabilität (Ghavampour et al., 2018). Eine entscheidende Rolle von CEACAM1 in der Pathophysiologie der Atherosklerose ist mittlerweile hinreichend belegt (Najjar et al., 2013; Ghavampour et al., 2018). Als wichtige Marker einer intakten Endothelfunktion gelten die Expression der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) (Najjar et al., 2013), des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktorrezeptors-2 (VEGFR-2) (Najjar et al., 2013) und des VE-Cadherins (Giannotta et al., 2013). In Aorten von CEACAM1-defizienten Mäusen (CC1^{-/-}-Mäusen) konnte eine Veränderung der Expression dieser Moleküle im Vergleich mit C57BL/6J-Mäusen (Wildtyp) festgestellt werden (Najjar et al., 2013).

1.6 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist:

- 1) Die Etablierung eines tierexperimentellen Versuchsmodells, das uns ermöglicht, neurogene Entzündungsreaktionen in den Atemwegen der Maus zu visualisieren und zu quantifizieren.
- 2) Die Entstehung einer neurogenen Entzündung durch Stimulation trachealer Bürstenzellen mit dem bakteriellen Bitterstoff Cycloheximid zu untersuchen.
- 3) Die Untersuchung, inwieweit ein Endotheldefekt, wie das Fehlen des CEACAM1-Moleküls, das Entzündungsgeschehen beeinflusst.

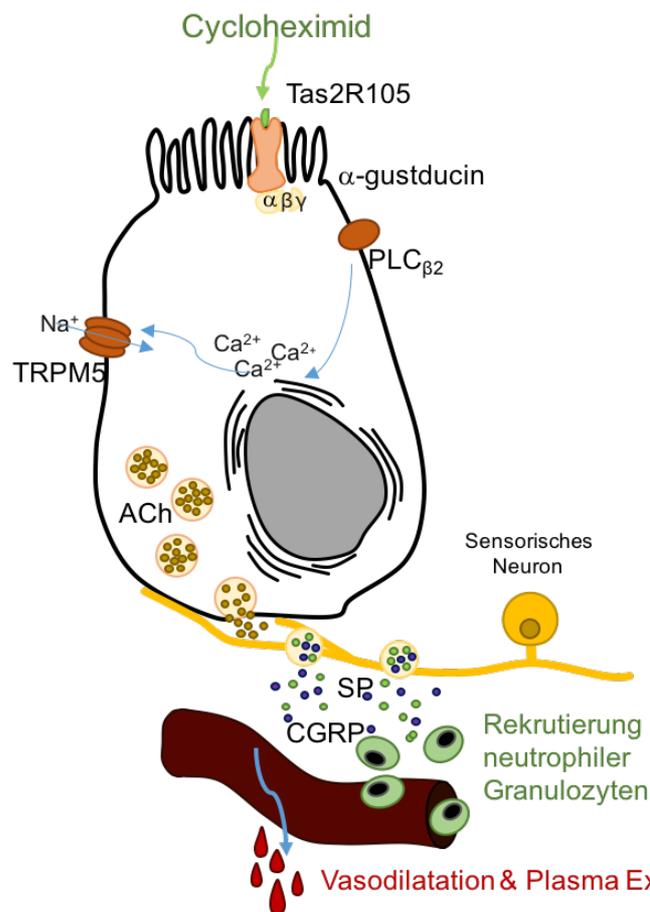


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Arbeitshypothese zur Entstehung einer neurogenen Entzündungsreaktion in den Atemwegen durch die Stimulation von Bürstenzellen mittels Cycloheximid.

Dargestellt ist eine Bürstenzelle, die den Geschmacksrezeptor Tas2R105 und die Komponenten der Geschmackstransduktionskaskade (alpha-Gustducin, PLCβ2, TRPM5) zur Wahrnehmung von Bitterstoffen exprimiert. Zudem synthetisiert sie den Neurotransmitter ACh. Die Bürstenzelle wird von einer sensorischen Nervenfaser kontaktiert, die in Varikositäten die Neurotransmitter SP und CGRP enthält. Die Neurotransmitter werden nach Stimulation der Nervenfaser durch ACh freigesetzt und bewirken eine Vasodilatation, Plasmaextravasation und die Migration neutrophiler Granulozyten.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Geräte und Chemikalien

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien

| Produkt | Hersteller |
|--|--|
| Cycloheximid | Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland |
| DAPI | Roche Applied Science, Penzberg, Bayern, Deutschland |
| D(+)-Saccharose | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Evans Blue | Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Formaldehydlösung (37%) | AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| Glycerol | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Heparin-Natrium-25000 | Ratiopharm, Ulm, Deutschland |
| Isofluran | Baxter GmbH, Unterschleißheim, Deutschland |
| Isopentan pure | AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| Mowiol | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| NaH ₂ PO ₄ Natriumdihydrogenphosphat- Monohydrat | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Na ₂ HPO ₄ Dinatriumphosphat | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Natriumchlorid | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |

| | |
|------------------------------|--|
| normales Pferdeserum (NHS) | PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich |
| Paraformaldehyd | AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| Pikrinsäure | AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| Polyvinylpyrrolidon (K30) | AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| Procainhydrochlorid | Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Rinderserumalbumin (BSA) | Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Tissue-Tek O.C.T COMPOUND | Sakura, Alphen aan den Rijn, Niederlande |
| Tris Puffer | Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Triton X-100 | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Tween 20 | Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Urethan | Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland |

Tabelle 2: Verwendete Geräte und Programme

| Produkt | Hersteller |
|---|---|
| Adhäsions-Objektträger SuperFrost plus | R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland |
| AxioCam MRc | Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland |
| Axioskop 2 mot plus | Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland |
| Axiovision Version 4.8.2 | Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland |
| Deckgläser | A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland |
| Filter | AHF Analysentechnik AG, Tübingen, Deutschland |
| Halogenlampe HAL 100 | Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland |

| | |
|-------------------------------|--|
| HBO 100 Illuminator Lamp | Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland |
| ImageJ 1.50a | Wayne Rasband, National Institut of Health, USA, Image Processing and Analysis in Java |
| Leica CM 3050S | Leica Camera AG, Wetzlar, Deutschland |
| LEJ EBQ 100 | LEJ - Leistungselektronik Jena GmbH |
| PAP pen for immunostaining | Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Plan-Apochromat 20x/0,8 Korr | Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland |
| Plan-Apochromat 40x/0,95 Korr | Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland |
| Stericup filter units | Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA |
| 12-Well-Mikrotiterplatten | Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland |

Tabelle 3: Verwendete Präparationsinstrumente.

| Produkt | Hersteller |
|---|--|
| Neo-Lab-Dumont Pinzetten Inox Nr. 5 | Dumont, Montignez, Schweiz |
| Pinzette, Student Adson Forceps - Serrated | F.S.T. Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland |
| Schere, Iris Scissors, gerade | F.S.T. Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland |
| Mikroschere, gerade, Typ Vannas, Schnittlänge 8,5 mm | Vertrieb durch NeoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland |

2.2 Rezepte zur Herstellung der Gebrauchslösungen

0,1 M Phosphat-Puffer (PP)

- Stock-Lösung A: 15,6 g/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
- Stock-Lösung B: 17,8 g/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$

Für einen Liter: 115 ml Lösung A + 385 ml Lösung B + 500 ml H_2O destilliert (dest.) mischen und den pH-Wert auf 7,4 einstellen.

0,005 M phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)

28,75 ml Stock-Lösung A mit 96,2 ml Stock-Lösung B mischen.

22,4 g NaCl zugeben und mit H_2O (dest.) auf 5 l auffüllen. Den pH-Wert auf 7,4 einstellen.

Cycloheximid

Stock-Lösung: 20 mM, Verdünnung mit H_2O (dest.)

Verdünnungen: (10 mM, 1 mM, 100 μM) mit PBS

Urethan

25% in H_2O (dest.)

Evans Blue

4 mg/ml in PBS

Spüllösung

2,5% Polyvinylpyrrolidon mit 0,9% NaCl und 0,5% Procainhydrochlorid mischen.

Den pH-Wert auf 7,4 einstellen.

4% Paraformaldehyd in 0,1 PP (4% PFA)

8% w/v Paraformaldehyd in H_2O (dest.) geben und auf 70°C erhitzen.

Tropfenweise 2 M NaOH zugeben bis die Lösung klar wird. Auf Raumtemperatur abkühlen. Gleiches Volumen 0,2 M Phosphat-Puffer, pH 7,4, zugeben und durch

einen Filter mit Porenstärken von 0,6 µm filtrieren. Den pH-Wert auf 7,4 einstellen.

20% Saccharose

Phosphat-Puffer 0,1 M, pH 7,4 mit 20% Saccharose mischen.

Mowiol

6 g Glycerol, 2,4 g Mowiol und 6 ml H₂O (dest.) in 12 ml 0,2 M Tris Puffer (pH 8,6) 4 h rühren. Anschließend 2 h zuwarten. Für 10 min bei 50°C im Wasserbad inkubieren. Zentrifugieren: 5000 g für 15 min. Aliquotieren und Lagerung bei -20°C.

Zamboni Fixans (2% Formaldehyd in 0,1 M PP + 15% Pikrinsäure)

200 ml Lösung A mit 300 ml Lösung B mischen. 50 ml 37% Formaldehyd Lösung, 150 ml zweifach gefilterte, gesättigte Pikrinsäure und 300 ml H₂O (dest.) zufügen.

Blocklösung

0,1% Rinderserumalbumin (BSA) (in PBS, pH = 7,4), 10% normales Pferdeserum (NHS) und 0,5% Tween 20 (in PBS, pH = 7,4) mischen.

2.3 Versuchstiere

Für die *in vivo* Versuche wurden C57BL/6J (Wildtyp, WT) und CEACAM1-Knockout-Mäuse (CC1^{-/-}) mit einem C57BL/6J Hintergrund verwendet. Die Mäuse stammten aus der Tierzucht des Physiologischen Instituts der JMU Würzburg und wurden dort unter Standardbedingungen bei Normaldiät gehalten. Es wurden sowohl männliche als auch weibliche mindestens 12 Wochen alte Tiere, verwendet, deren Gewicht im Schnitt zwischen 20 und 35 Gramm lag. Die Generierung der CC1^{-/-}-Mäuse erfolgte durch Leung et al. (Leung et al., 2006). Zur Darstellung von Bürstenzellen wurden Präparate von transgenen ChAT^{BAC}-eGFP-Mäusen genutzt. Diese Mäuse exprimieren das grün fluoreszierende Protein (GFP). Die transgenen Mäuse wurden von Tallini et. al (2006) generiert,

indem mit Hilfe eines Bakterienchromosoms (BAC) ein eGFP-Gen im Bereich des ChAT-Locus eingefügt wurde (Tallini et al., 2006). Die Berechtigung zur Durchführung der Tierversuche wurde vom Regierungspräsidium Unterfranken erteilt. Antragsnummer: AZ-55.2.2532-2-98.

2.4 Durchführung der *in vivo* Versuche

Zur Intubation der Mäuse wurden Plastikschräuche mit einem Außendurchmesser von 1,2 mm und einem Innendurchmesser von 0,7 mm verwendet. Diese Atmungskanülen wurden, nach leichter Erwärmung über einer Flamme, in einem Winkel von ca. 60° gebogen. Um den Vorschub in die Trachea zu erleichtern, wurde ein Ende schräg angeschnitten. Für jede Maus wurde jeweils eine Kanüle verwendet, die bis zum nächsten Versuch für mindestens 24 Stunden in 97% Ethanol aufbewahrt wurde. Die 20 mM Cycloheximid-Stammlösung wurde mit destilliertem Wasser angesetzt, in 0,5 ml Cups aliquotiert und bei -20°C gelagert. Am jeweiligen Versuchstag wurde ein Cup im beheizten Ultraschallbad aufgetaut und die drei benötigten Verdünnungen hergestellt.

Die Mäuse wurden zu Versuchsbeginn gewogen und bekamen pro Gramm Körpergewicht 6,67 µl 25% Urethan (Sigma-Aldrich GmbH; Steinheim, Deutschland) intraperitoneal injiziert. Durch diese Dosierung konnte eine adäquate Anästhesie zur Durchführung des Versuches bei persistierender Atmung sichergestellt werden. Ab dem Zeitpunkt der Urethan-Injektion wurde die Maus für 30 Minuten auf eine Wärmedecke mit 36°C gelegt. Um in der Auswertung des Versuches das Ausmaß der Plasmaextravasation sichtbar zu machen, wurde den Mäusen im Anschluss 0,2 µl Evans Blue (Sigma-Aldrich GmbH; Steinheim, Deutschland) in den retroorbitalen Venenplexus injiziert (Sorg & Buckner, 1964).

Nach erfolgter Evans-Blue-Injektion wurde die Maus fixiert und 5 Minuten abgewartet. Zur Freilegung der Trachea wurde, nach Entfernung längerer Haare, ein ca. 1,5 cm langer Schnitt in der Medianlinie des Halses, unterhalb des Kehlkopfes, gesetzt. Danach wurden die sofort sichtbaren Speicheldrüsen unter

Vermeidung kleiner Blutungen stumpf auseinander präpariert. Auch die infrahyale Muskulatur wurde stumpf auseinander gedrängt, um die darunterliegende Trachea darzustellen. Das Ligamentum (Lig.) cricothyroideum medianum wurde durchtrennt und die vorgebogene Atmungskanüle ca. 2-3 mm in die Trachea vorgeschoben. Mittels einer 10 µl Pipette wurden tröpfchenweise 4 µl Cycloheximid-Lösung durch die Kanüle verabreicht. Es wurden Versuche mit 10 mM, 1 mM und 100 µM Cycloheximid-Lösung durchgeführt. Den Vehikelkontrollen wurde phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) verabreicht (Kap. 2.2.). Nach Applikation des Cycloheximids bzw. der PBS-Lösung, wurde die Maus für 30 min wieder auf die Wärmedecke gelegt. Die Atmung erfolgte spontan durch die Kanüle. Die Perfusion wurde mit einer modifizierten Methode nach Gage, Kipke und Shain (2012) durchgeführt (Gage, Kipke, & Shain, 2012). Der Aufbau zur Perfusion bestand, wie in Abbildung 2 dargestellt, aus zwei leeren Infusionsbehältern samt Infusionsbesteck, die über einen Dreiwegehahn an eine Kanüle angeschlossen waren. In einen der Infusionsbehälter wurde die Spüllösung gefüllt, in den anderen das Fixans. Die Schläuche mussten vor Beginn der Perfusion komplett entlüftet werden. Vom Abdomen aufwärts bis zum Sternum wurde ein 3 cm langer Schnitt gesetzt. Das Diaphragma wurde an seinen Ansätzen am Rippenbogen durchtrennt. Zur freien Sicht auf Herz und Lunge wurden die Rippenbögen links und rechts auf Höhe der Medioklavikularlinie durchtrennt, das Sternum mithilfe einer Gefäßklemme fixiert und nach oben geklappt. Um die Bildung von Tromben zu vermeiden, wurde anschließend 0,1 ml Heparin (Heparin-Natrium-25000 Ratiopharm, Ulm, Deutschland) in den linken Herzventrikel injiziert. Zur Platzierung der Perfusionskanüle wurde mithilfe einer feinen, spitzen Schere ein Schnitt in die Spitze des linken Ventrikels gesetzt. Die Kanüle wurde maximal 2 mm in den Ventrikel vorgeschoben und anschließend mit einer gebogenen Gefäßklemme fixiert, um eine Perforation des Kammerseptums zu vermeiden. Zur Gewährleistung des Blut-, und Flüssigkeitsabflusses wurde ein Entlastungsschnitt im rechten Herzohr gesetzt.

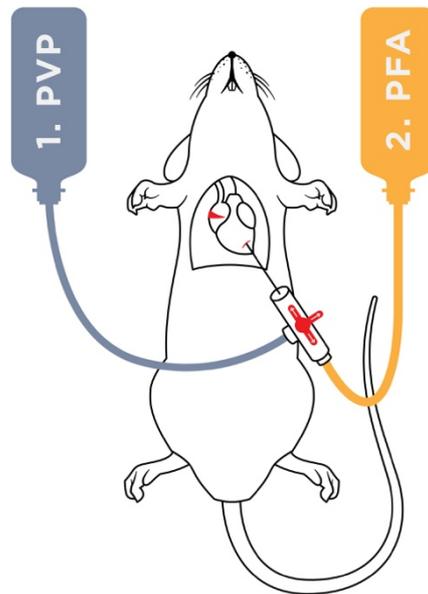


Abbildung 2: Perfusion - Abbildung modifiziert nach (Gage et al., 2012).

Zuerst wurde ein Plasmaaustausch mithilfe einer Spüllösung aus Polyvinylpyrrolidon MG 40.000 (PVP), Procainhydrochlorid und NaCl (Kap. 2.2) durchgeführt (Forssmann et al., 1977). Die Spülung des vaskulären Systems wurde so lange durchgeführt, bis die aus dem rechten Vorhof austretende Lösung klar war. In der Regel dauerte dieser erste Teil zwischen 10 und 15 Minuten. Anschließend wurde, ohne die Position der Kanüle zu verändern, der Dreiweghahn zum Durchlass der Fixationslösung eingestellt und der zweite Teil der Perfusion mit einer Lösung aus 4% Paraformaldehyd in 0,1 molarem Phosphatpuffer (4% PFA) (Kap. 2.2) fortgesetzt. Die Perfusion mit PFA dauerte wiederum 10-15 Minuten, bis die Extremitäten der Tiere begannen steif zu werden. Der korrekte Verlauf der Perfusion konnte an der sofort sichtbaren Entfärbung der Leber festgestellt werden. Eine Falschperfusion konnte in den meisten Fällen mit dem Verstellen des Dreiweghahns in Verbindung gebracht werden, da erst nach der Umstellung von PVP auf PFA Probleme auftraten, nachdem die Perfusion mit PVP fehlerfrei verlaufen war.

Zur Organentnahme wurde die Maus auf einer Unterlage fixiert. Durch einen beidseitigen Schnitt lateral der Medioklavikularlinie bis hinauf zur Klavikula konnte die Thoraxvorderwand entfernt werden. Die Trachea wurde unter Entfernung der infrahyalen Muskulatur freigelegt sowie Fett, Bindegewebe und Blutgefäße beseitigt. Nach möglichst herznaher Absetzung der zu- und abführenden Gefäße wurde das Herz zur Freilegung der Hauptbronchien entnommen.

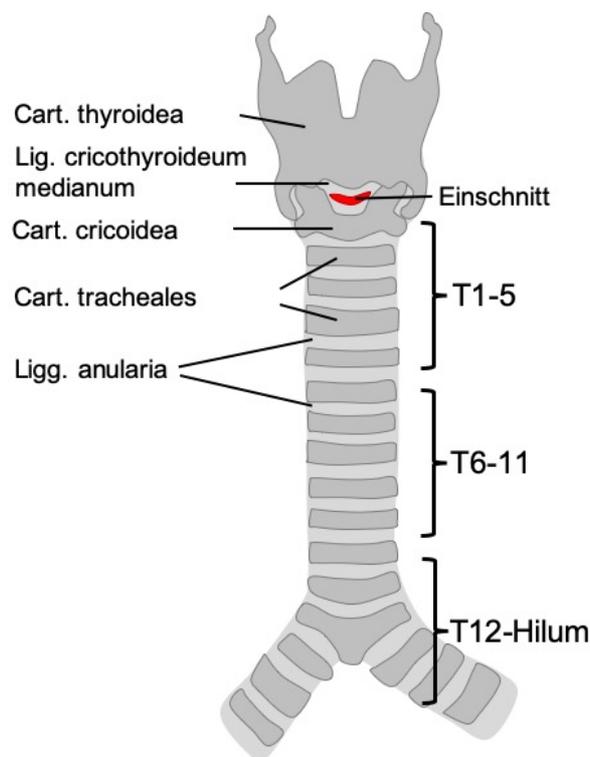


Abbildung 3: Aufteilung von Trachea und Bronchien bei der Entnahme.

Kehlkopfnaher trachealer Abschnitt (T1-5) vom Cartilago (Cart.) cricoidea bis zum 5. Cart. tracheales. Mittlerer trachealer Abschnitt (T6-11) mit den Cart. tracheales 6-11 und bronchialer Abschnitt (T12-Hilum) vom Cart. tracheales 12 bis zum Hilum pulmonale.

Die Trachea wurde gemeinsam mit dem Ösophagus, beginnend an der Stelle des Einschnitts für die Kanüle, in drei Segmenten entnommen (Abb. 3). Dabei wurde stets nur der benachbarte Ösophagus mit der Pinzette gehalten. Der kehlkopfnaher trachealer Abschnitt (T1-5) reichte vom Ringknorpel bis zum fünften Trachealknorpel. Der mittlere trachealer Abschnitt (T6-11) enthielt die Knorpelspannen 6-11. Der bronchiale Abschnitt (T12-Hilum) wurde möglichst

proximal am Hilum pulmonis abgesetzt und umfasste die restlichen Knorpelspangen sowie die Bronchi principales. Somit erhielt man zwei tracheale und ein bronchiales Präparat. Die Organpräparate wurden nach der Entnahme für eine weitere Stunde in 4% PFA (Kap. 2.2) durch Immersion fixiert und anschließend über Nacht bei 4°C in 20% Saccharose (Kap. 2.2) gelagert. Die Präparate wurden danach in Tissue-Tek (O.C.T. Compound, Sakura, Alphen aan den Rijn, Niederlande), einem wasserlöslichen Einbettmedium aus Glykolen und Harzen, eingebettet. Dafür wurden die Präparate einzeln in kleinen Blöcken in bei -20°C vorgekühltem Isopentan (2-Methylbutan, AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland), das in einen durch flüssigen Stickstoff gekühlten Kupferzylinder gefüllt war, gefroren. Die histologischen Schnitte wurden an einem Cryostat (CM 3050S, Leica Camera AG, Wetzlar, Deutschland) bei -20°C in einer Dicke von 10 µm angefertigt. Zur besseren Gewebeadhäsion wurden Adhäsions-Objektträger „SuperFrost plus“ verwendet (R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland). Pro Präparat wurde eine Serie angefertigt, sodass die Schnitte aus um jeweils 100 µm voneinander entfernten Bereichen der Trachea entstammten. Die Objektträger wurden zwei Stunden lichtgeschützt bei Raumtemperatur getrocknet. Zur Entfernung des Einbettmediums wurden die Schnitte anschließend, ebenfalls unter Lichtschutz, dreimal eine Minute in 0,005 M PBS (Kap. 2.2) gewaschen. Um die Rückstände des PBS auf den Präparaten zu entfernen, wurden diese vor dem Eindecken abschließend kurz in destilliertes Wasser getaucht. Die Objektträger wurden mit Mowiol (Kap. 2.2) eingedeckt und über Nacht lichtgeschützt getrocknet.

2.5 Immunhistochemie

2.5.1 Gewebeschnitte

Die 10 µm dünnen Schnitte wurden mit einem Fettstift (PAP pen for immunostaining Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) umrahmt. Um die Zellmembranen permeabel für Antikörper zu machen sowie freie Proteinbindungsstellen zur Vermeidung von unspezifischen Markierungen zu

sättigen, wurden die Schnitte für eine Stunde mit einer Blocklösung inkubiert (Kap. 2.2). Anschließend wurde die Blocklösung abgesaugt und die in PBS (Kap. 2.2) verdünnten Primärantikörper über Nacht lichtgeschützt auf den Schnitten in einer feuchten Kammer inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurden die Antikörper abgesaugt und die Schnitte dreimal für jeweils 10 Minuten lichtgeschützt in PBS gewaschen. Auch die Sekundärantikörper wurden mit PBS (Kap. 2.2) verdünnt und die Schnitte erneut für eine Stunde bei Raumtemperatur und unter Lichtschutz inkubiert. Dem anschließenden dreimal 10-minütigen Waschen folgte eine zehnminütige Fixierung mit 4% PFA (Kap. 2.2) und ein erneutes dreimal 10-minütiges Waschen in PBS. Die Objektträger wurden abschließend in destilliertes Wasser getaucht und mit Mowiol (Kap. 2.2) eingedeckt. Der direkt markierte Ly6G-Antikörper wurde 1:200 verdünnt und je 25 µl der Verdünnung wurden auf den Schnitten lichtgeschützt über Nacht in einer feuchten Kammer inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte für 10 Minuten mit 10 µl DAPI (1:10 000, Roche Applied Science, Penzberg, Bayern, Deutschland) inkubiert und dreimal für 10 Minuten in PBS gewaschen. Abschließend wurden die Objektträger in destilliertes Wasser getaucht und mit Mowiol eingedeckt.

2.5.2 Whole-Mount Präparate

Um die räumliche Beziehung der Bürstenzellen in der Trachea zu CGRP-positiven Nervenfasern darzustellen, wurden Whole-Mount Präparate angefertigt. Zur Darstellung der Bürstenzellen wurden transgene ChAT^{BAC}-eGFP Mäuse verwendet. Die Mäuse wurden zunächst mit einer PVP-Spüllösung (Kap. 2.2) und anschließend mit dem Zamboni Fixans (Kap. 2.2) perfundiert. Die Trachea wurde im Ganzen entnommen und anschließend in vier Stücke geteilt. Im Anschluss an eine vierstündige Nachfixierung mit Zamboni wurden die Präparate für sechs Tage in Phosphatpuffer (Kap. 2.2) gewaschen. Die Immunfärbung wurde nach einem Protokoll von Veres et al. durchgeführt (Veres et al., 2009). Zunächst wurden die Präparate in 12-Well Mikrotiterplatten (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) für 15 Minuten in PBS gewaschen. Die

Permabilisierung erfolgte mit 0,3 prozentigem Triton X-100 (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) in PBS (Kap. 2.2) für zwei Stunden. Im Anschluss wurde eine Blocklösung aus 4% Pferdeserum (NHS, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) und 1% Rinderserumalbumin (BSA Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA in PBS, pH = 7,4) in die Mikrotiterplatten eingebracht. Die Inkubation mit Primär- (Tab. 4) und Sekundärantikörpern (Tab. 5) erfolgte jeweils bei Raumtemperatur über Nacht. Im Anschluss wurde das Gewebe fünfmal für 30 Minuten in PBS (Kap. 2.2) gewaschen und vor der Inkubation mit dem nächsten Antikörper erneut zwei Stunden mit oben genannter Blocklösung behandelt. Für jeden Primärantikörper wurde ein neues Well verwendet. Im Anschluss an die Immunfluoreszenzfärbung wurden die Präparate für 10 Minuten mit PFA (Kap. 2.2.) fixiert, anschließend dreimal für 30 Minuten in PBS (Kap. 2.2) gewaschen und mit Mowiol (Kap. 2.2) eingedeckt. Zum Eindecken wurde die Trachea mittig in der Paries membranacea aufgeschnitten und, mit dem Epithel nach oben ausgerichtet, eingedeckt. Auch in diesem Fall wurde zum Eindecken Mowiol (Kap. 2.2) verwendet.

2.5.3 Verwendete Antikörper

Tabelle 4: Für die Immunfluoreszenzmarkierung verwendete Primärantikörper

m = monoclonal, p = polyclonal.

| Antigen | Wirt | Verdünnung | Quelle |
|----------------|--------------|-------------------|---|
| Anti-GFP | Huhn, p | 1:500 | Abcam, Cambridge, UK Lotnummer: GR89472-15 |
| CD31 | Ratte, m | 1:400 | Dianova, Hamburg, Deutschland |
| CGRP | Ziege, p | 1:1600 | OriGen Technologies Inc. Rockville, MD, USA Lotnummer: 0515 |
| CGRP | Kaninchen, p | 1:20 000 | Peninsula Laboratories International, Inc., San Carlos, USA |

| | | | |
|------|--------|-------|---|
| Ly6G | Rat, m | 1:200 | Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA |
|------|--------|-------|---|

Tabelle 5: Für die Immunfluoreszenzmarkierung verwendete Sekundärantikörper

m = monoclonal p = polyclonal, kursiv: Konzentrationen für Whole-Mount Präparate.

| Antigen | Wirt | Konjugat | Verdünnung | Quelle |
|----------------|-------------|-----------------|------------------------|---|
| Ziegen-IgG | Esel | Cy3 | 1:800 | Dianova, Hamburg, Deutschland Lotnummer: 105096 |
| Kaninchen-IgG | Esel | Cy3 | 1:1000 <i>1:500</i> | Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA Lotnummer: 2548999 |
| Ratten-IgG | Ziege | Cy5 | 1:500 <i>1:250</i> | Dianova, Hamburg, Deutschland Lotnummer: 105793 |
| Huhn-IgY | Ziege | Cy2 | 1:1000 <i>1:500</i> | ThermoFischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA Lotnummer: 1637891 |

2.5.4 Dokumentation

Die Auswertung und Dokumentation der Versuche erfolgte mit den bereits in Kapitel 2.1 aufgeführten Geräten. Zu den Fluorochromen wurden jeweils passende Filter gewählt. Es wurde die individuell vom Programm festgelegte Belichtungszeit bei der Fotografie der Präparate verwendet.

2.6 Versuchsauswertung

Die Schnitte wurden stets am Tag nach dem Eindecken an einem Epifluoreszenzmikroskop (Axioskop 2 mot plus Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland) bei zwanzigfacher Vergrößerung (Plan-Apochromat 20x/0,8 Korr,

Carl Zeiss AG) mithilfe einer AxioCam MRc (Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland) fotografiert. Zur Aufnahme des Evans Blues wurde ein Texas Red Filter (AHF Analyseptechneik AG, Tübingen, Deutschland) verwendet. Zum Vergleich der drei Trachealabschnitte untereinander wurden alle Präparate zuerst mit einer einheitlichen Belichtungszeit von 45 ms abfotografiert. Um die Wirkung der drei verschiedenen Konzentrationen im gleichen Trachealabschnitt miteinander vergleichen zu können, wurden diese und die Vehikelkontrollen mit einer optimierten Belichtungszeit für den entsprechenden Abschnitt aufgenommen. Im Abschnitt T1-5 betrug die optimierte Belichtungszeit 45 ms, im Abschnitt T6-11 55 ms und im Abschnitt T12-Hilum 80 ms.

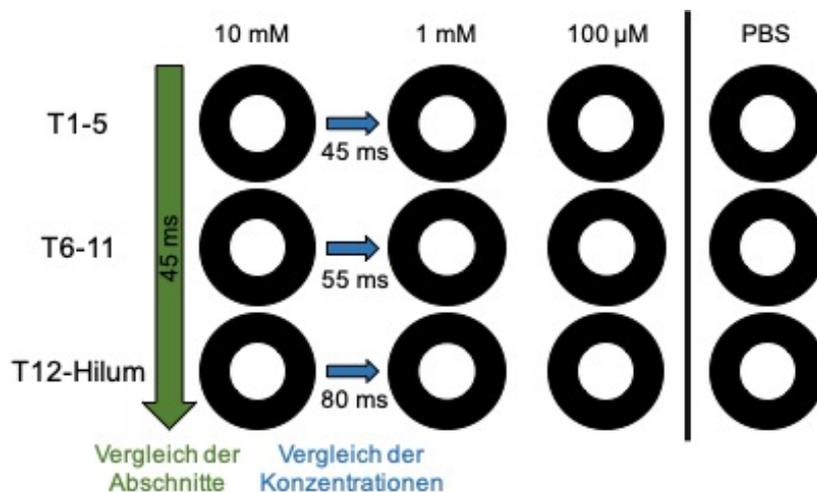


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Dokumentationsweise.

Zur Auswertung der Schnitte mussten die einzelnen Fotos zunächst in Powerpoint zu ganzen Trachealringen zusammengesetzt werden. Für die Messung der Fluoreszenz wurde das Programm ImageJ 1.50a verwendet. Mittels dieses Programms war es möglich, manuell Bildbereiche auszuwählen und diese hinsichtlich verschiedener Parameter zu untersuchen.

Für die Fragestellung waren folgende Parameter von Bedeutung:

- Größe der markierten Fläche (μm^2),
- Fluoreszenzintensität in der ausgewählten Fläche (Summe der Pixelwerte),
- Mittlere Fluoreszenzintensität pro Fläche (Pixelwert / μm^2).

Die Kalibrierung erfolgte mittels einer am Mikroskop mit 20-facher Vergrößerung fotografierten Messscala.

2.7 Quantifizierung der Granulozytenmigration

Es wurden alle Versuche, die auch zur Quantifizierung der Plasmaextravasation herangezogen wurden, ausgewertet. Pro Konzentration wurden somit in jedem der drei Trachealabschnitte drei Versuche mit jeweils 5 Schnitten, im Abstand von 100 µm, ausgewertet. Hierzu wurden die neutrophilen Granulozyten mithilfe eines Antikörpers gegen das Ly6G-Oberflächenantigen markiert. Der Antikörper war mit dem Fluorochrom Fluoresceinisothiocyanat (FITC) direkt markiert (monoklonaler Ly6G-Antikörper aus der Ratte, Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Bei der Zählung der Granulozyten wurde bezüglich ihrer Lokalisation in intra- und extraepithelial unterschieden.

2.8 Statistik

Für die statistische Datenanalyse wurde das Programm SPSS Statistics Version 23.0.0.0 der Firma IBM (Copyright IBM Corporation and licensors 1989, 2015) verwendet. Der Test auf Normalverteilung der Daten erfolgte durch den Shapiro-Wilk-Test. Dieser zeigte nur in einzelnen Gruppen eine Normalverteilung der Daten, weswegen einheitlich nichtparametrische Tests angewandt wurden. Stammt die Daten aus zwei verschiedenen Trachealabschnitten eines Tieres, wurden sie als abhängige Stichproben getestet, in allen anderen Fällen als unabhängige Stichproben. Bei unabhängigen Stichproben wurde der Kruskal-Wallis-Test (H-Test) durchgeführt, gefolgt vom Mann-Whitney-U-Test. Bei abhängigen Stichproben wurde der Wilcoxon-Test angewandt. Lagen die Ergebnisse bei $p \leq 0,05$ wurden sie als signifikant eingestuft, bei $p \leq 0,01$ als sehr signifikant und bei $p \leq 0,001$ als hoch signifikant.

2.9 Durchführung der CGRP-Messung

Durch die Arbeitsgruppe von Tatjana I. Kichko und Peter W. Reeh wurden bei WT-Mäusen die Trachea samt der Bronchi entnommen. Die Präparate wurden entlang der Sagittalen mittig halbiert. Eine Hälfte wurde als Kontrolle verwendet. Die Präparate wurden bei 37°C für 30 Minuten in Carbogen-begaster (95% O₂, 5% CO₂, pH 7,4), synthetischer interstitieller Flüssigkeit (SIF) inkubiert. Die SIF bestand aus 107,8 mM NaCl, 3,5 mM KCl, 1,53 mM CaCl₂, 0,69 mM MgSO₄, 26,2 mM NaHCO₃, 1,67 mM NaH₂PO₄ und 9,64 mM Natriumgluconat. Nach der initialen Ruhephase wurden die Präparate nacheinander in vier Teströhrchen für jeweils fünf Minuten mit 125 µl SIF bei 37°C unter Bewegung inkubiert. Die ersten beiden Inkubationen dienten der Ermittlung der basalen CGRP-Freisetzung und Abweichungen bei 37°C. Im dritten Teströhrchen befand sich Cycloheximid, gelöst in SIF. Das vierte Teströhrchen diente der Auswaschung und Überprüfung des Rückgangs der Antwort. Der CGRP-Gehalt der Inkubationsflüssigkeit wurde mithilfe eines kommerziellen CGRP-Enzym-Immunoassay (EIA)-Kits mit einem Schwellenwert zur CGRP-Detektion von 2 pg/ml (Bertin Pharma, Montigny-le-Bretonneux, France) bestimmt. Zur Konzentrationsbestimmung wurden 100 µl des Muster-Fluids auf Eis gelagert und unmittelbar nach Inkubation der Trachea mit 25 µl 5-fach konzentriertem kommerziellem CGRP-EIA Puffer gemischt. Der CGRP-EIA-Puffer enthielt einen Cocktail aus Peptidaseinhibitoren. Der CGRP-Gehalt wurde am Ende des Experimentes bestimmt. Die Antikörperreaktion geschah über Nacht. Die EIA-Platten wurden mithilfe eines Mikroplattenlesers (Dynatech, Channel Islands, UK) photometrisch ausgewertet. Als Ergebnis wurde die Konzentration von CGRP in Pikogramm pro ml SIF angegeben. Zur Reduktion der interindividuellen und tagesabhängigen Variabilität wurden die Daten anhand des zweiten individuellen Ausgangswertes (vor Stimulation) normalisiert. Dieser Ausgangswert wurde von allen vier Datenpunkten des typischen Experiments abgezogen, sodass nur die absolute Veränderung der CGRP-Freisetzung (Δ -Pikogramm pro ml) in der Grafik dargestellt ist (Kichko et al., 2013).

3 Ergebnisse

3.1 Bürstenzellen im Trachealepithel

CGRP-immunreaktive Nervenfasern (Pfeilköpfe) wurden direkt unterhalb der Basalmembran, in der Lamina Propria der Trachealmukosa, nachgewiesen. Sie kontaktierten birnenförmige, sich zum Lumen hin verjüngende, ChAT-positive Zellen (Pfeile in Abb. 5).

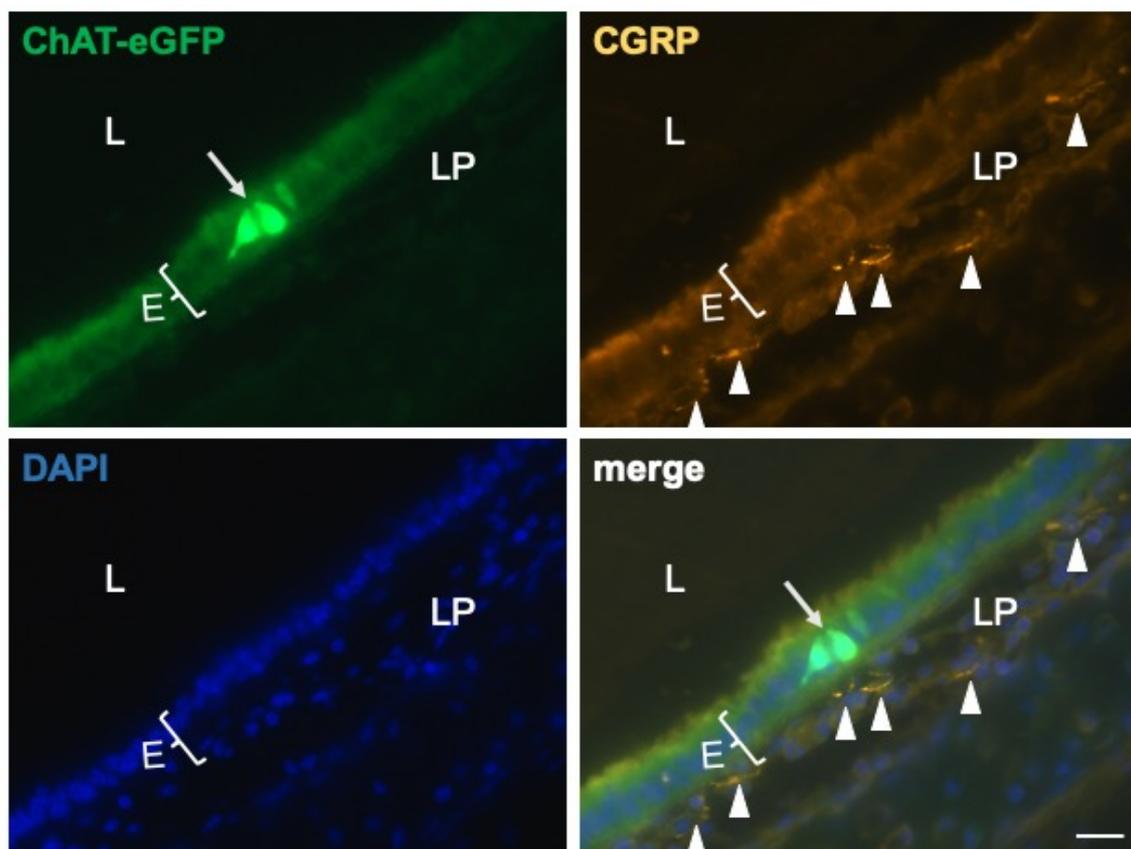


Abbildung 5: Immunhistochemie der Trachea mit Antikörpern gegen CGRP und DNA (DAPI). Die Pfeile markieren birnenförmige ChAT-eGFP immunreaktive Zellen im Trachealepithel. Die Pfeilköpfe markieren CGRP-immunreaktive Nervenfasern. Klammer: markiert das Trachealepithel (E). LP: Lamina propria, L: Lumen der Trachea, Balken: 20 µm.

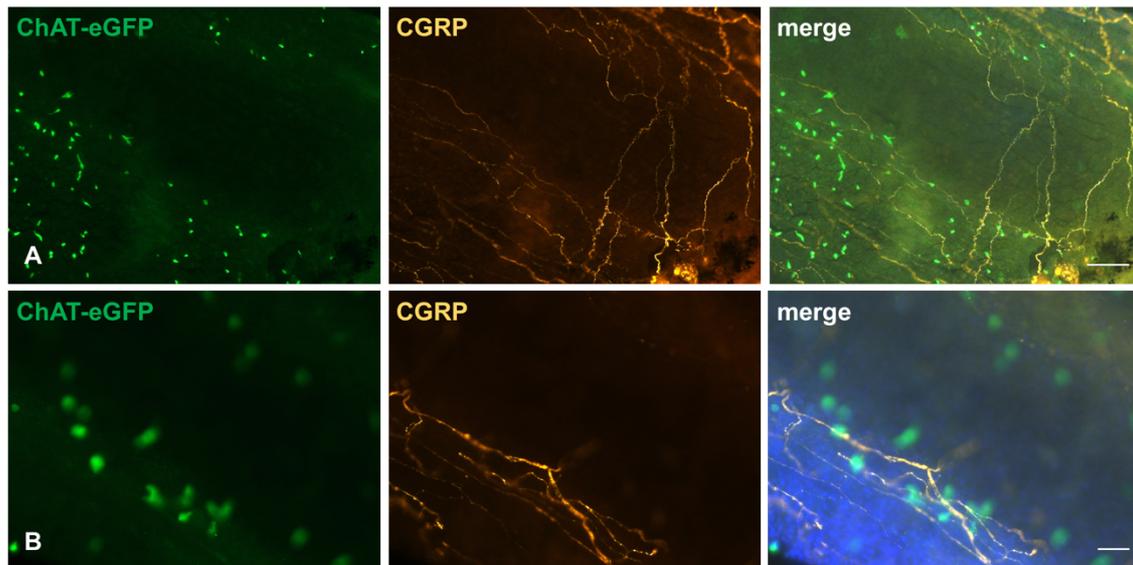


Abbildung 6: Immunhistochemie eines Whole-Mount Präparats der Trachea mit Antikörpern gegen CGRP und DNA (DAPI).

ChAT-eGFP-positive Zellen (grün) entlang von CGRP-positiven Nervenfasern (orange). Balken A: 50 µm, Balken B: 20 µm.

Auch im Whole-Mount Präparat der Trachea konnten ChAT-positive Zellen entlang der CGRP-immunreaktiven Nervenfasern nachgewiesen werden (Abb. 6).

3.2 Etablierung eines *in vivo* Versuchsmodells

Insgesamt wurden im Zuge dieser Dissertationsarbeit 54 Versuche nach diesem Protokoll durchgeführt. Aufgrund falscher Perfusion wurden 8 der 54 Versuche nicht in die Auswertung aufgenommen, was 14,81% entspricht. Als häufige Fehlerquelle stellte sich eine falsche bzw. verrutschte Lage der Perfusionskanüle heraus, was zu einer Perfusion des Lungenkreislaufs führte. In diesen Fällen trat Perfusionslösung aus der Nase und der Eröffnungsstelle an der Trachea aus. In lediglich zwei Versuchen verstarb das Tier bereits vor dem Ablauf der Inhalationszeit des Cycloheximids.

3.3 Einfluss von Atemwegskanüle und Flüssigkeitsapplikation auf die Plasmaextravasation

Zunächst wurde untersucht, ob das Einbringen der Atemwegskanüle und die anschließende Flüssigkeitsapplikation zu einer Reizung führen. Das Einbringen der Kanüle im kehlkopfnahen Bereich der Trachea (T1-5) führte zu keiner signifikant erhöhten Plasmaextravasation (n.s.: $p = 0,841$, Abb. 7). Hingegen bewirkte die zusätzliche Applikation von PBS-Lösung in diesem Bereich eine signifikant erhöhte Plasmaextravasation ($p = 0,019$, $p = 0,011$, Abb. 7). Im mittleren Abschnitt der Trachea (T6-11) und im bronchialen Abschnitt (T12-Hilum) hatte weder das Einbringen der Kanüle noch die Applikation von PBS-Lösung einen signifikanten Einfluss auf die Plasmaextravasation ($p > 0,05$, Abb. 7). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde der kehlkopfnahen Trachealabschnitt (T1-5) bei den Untersuchungen zur Cycloheximid-induzierten Plasmaextravasation in die Auswertung nicht einbezogen.

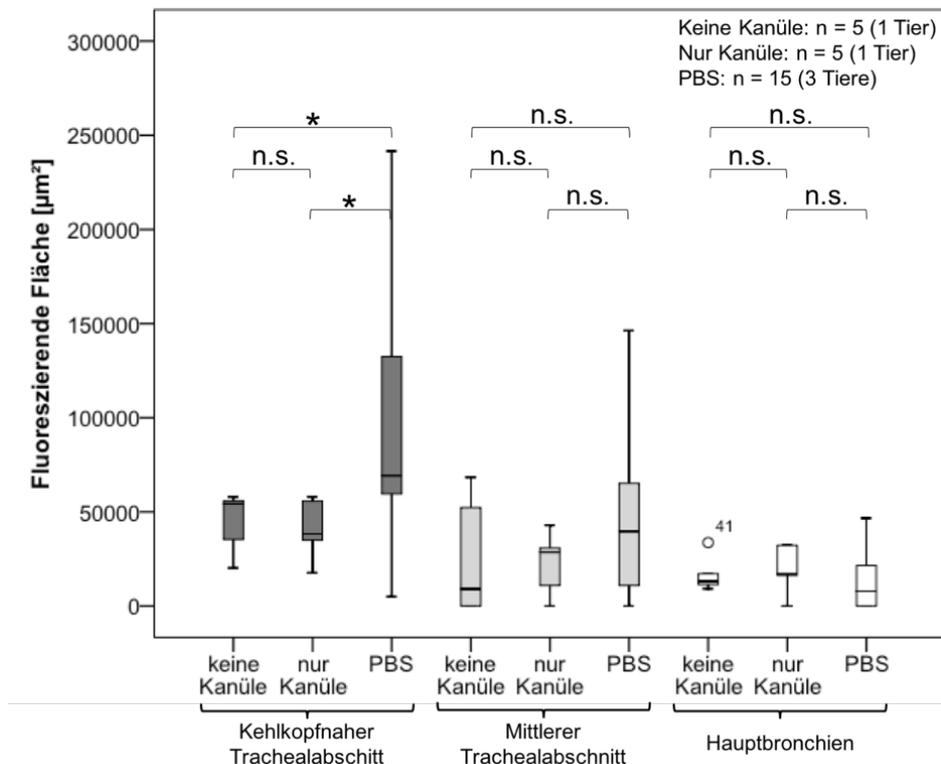


Abbildung 7: Einfluss der Kanülenapplikation und der PBS-Gabe durch eine Kanüle auf die Plasmaextravasation in der Trachea und den extrapulmonalen Bronchien (Hauptbronchien) von WT-Mäusen, verglichen mit der Plasmaextravasation bei keiner Kanülenapplikation.

Kehlkopfnaher Trachealabschnitt (dunkelgrau), mittlerer Trachealabschnitt (hellgrau) und Hauptbronchien (weiß). Die Fluoreszenz wurden bei einer Belichtungszeit von 45 ms aufgenommen. Boxplots: Minimum (unterer Strich), Maximum (oberer Strich) und Medianwert (Strich in der Box) sowie die Perzentile 25 (unteres Ende der Box) und 75 (oberes Ende der Box). ° = Datenpunkt außerhalb der dreifachen Standardabweichung. Mann-Whitney-Test: * $p \leq 0,05$, nicht signifikant (n.s.): $p > 0,05$.

3.4 Vergleich der Plasmaextravasation in Trachea und Bronchus

Zum Vergleich der Plasmaextravasation im mittleren trachealen und bronchialen Abschnitt der Trachea, nach Verabreichung von Cycloheximid oder PBS, wurde eine einheitliche Belichtungszeit gewählt, die nach optischer Sichtung der höchsten Konzentration auf 45 ms festgelegt wurde. Das Gewebe des mittleren trachealen Abschnittes, insbesondere das Epithel und die Knorpelspangen, zeigten eine deutlich stärkere Autofluoreszenz, als das Gewebe des bronchialen Abschnittes. Die Belichtungszeit von 45 ms erwies sich beim Vergleich des mikroskopischen Bildes mit der fotografischen Aufnahme als sehr gering. Eine höhere einheitliche Belichtungszeit konnte jedoch nicht gewählt werden, da sonst der tracheale Abschnitt überbelichtet worden wäre. Die WT-Mäuse zeigten eine signifikant geringere Plasmaextravasation im bronchialen Abschnitt im Vergleich zum trachealen Abschnitt nach Verabreichung von PBS ($p = 0,011$). Dieser Unterschied war auch bei 10 mM Cycloheximid zu beobachten ($p = 0,002$). CC1^{-/-}-Mäuse wiesen keinen Unterschied in der basalen Plasmaextravasation (nach PBS) zwischen Trachea und Bronchen auf. Es kam zu einer signifikant geringeren ($p = 0,026$) Plasmaextravasation im bronchialen Abschnitt nach Verabreichung von 100 μ M Cycloheximid (Abb. 8).

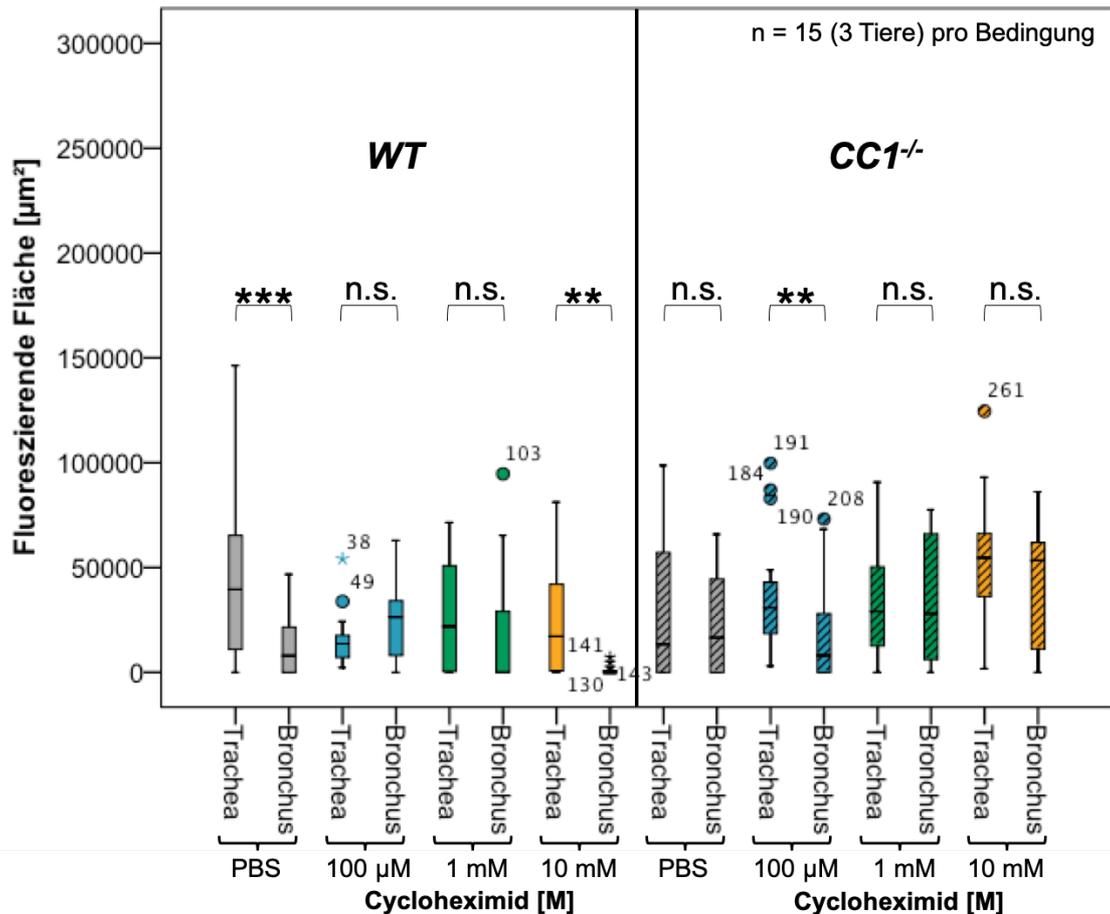


Abbildung 8: Plasmaextravasation in Trachea und Bronchus bei WT- und $CC1^{-/-}$ -Mäusen (schraffiert) nach Verabreichung von Cycloheximid in den Konzentrationen 100 μM (blau), 1 mM (grün), 10 mM (gelb) und PBS-Lösung (grau) als Vehikelkontrolle. Die Fluoreszenz wurden bei einer Belichtungszeit von 45 ms aufgenommen. Boxplots: Minimum (unterer Strich), Maximum (oberer Strich) und Medianwert (Strich in der Box) sowie die Perzentile 25 (unteres Ende der Box) und 75 (oberes Ende der Box). ° = Datenpunkt außerhalb der dreifachen Standardabweichung. Wilcoxon-Test: ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, nicht signifikant (n.s.): $p > 0,05$.

3.5 Vergleich der basalen Permeabilität bei WT- und $CC1^{-/-}$ -Mäusen

Um keine Effekte zu übersehen, wurde beim Vergleich der Konzentrationen und Mausstämmen für jeden Abschnitt eine optimierte Belichtungszeit festgelegt. Die Ermittlung der optimalen Belichtungszeit erfolgte jeweils durch optische Sichtung der höchsten Konzentration. Für den mittleren trachealen Abschnitt ergab sich eine optimale Belichtungszeit von 55 ms und für den bronchialen Abschnitt eine

optimierte Belichtungszeit von 80 ms. Beim Vergleich der basalen Permeabilität des Endothels zeigten $CC1^{-/-}$ -Mäuse nach Verabreichung von PBS-Lösung eine geringere ($p = 0,021$) Plasmaextravasation im mittleren Trachealabschnitt. Im Bereich der Hauptbronchien unterschied sich das Ausmaß der Plasmaextravasation nicht signifikant ($p = 0,461$) (Abb. 9). Die Aufnahmen wurden mit der optimalen Belichtungszeit für den jeweiligen Abschnitt angefertigt.

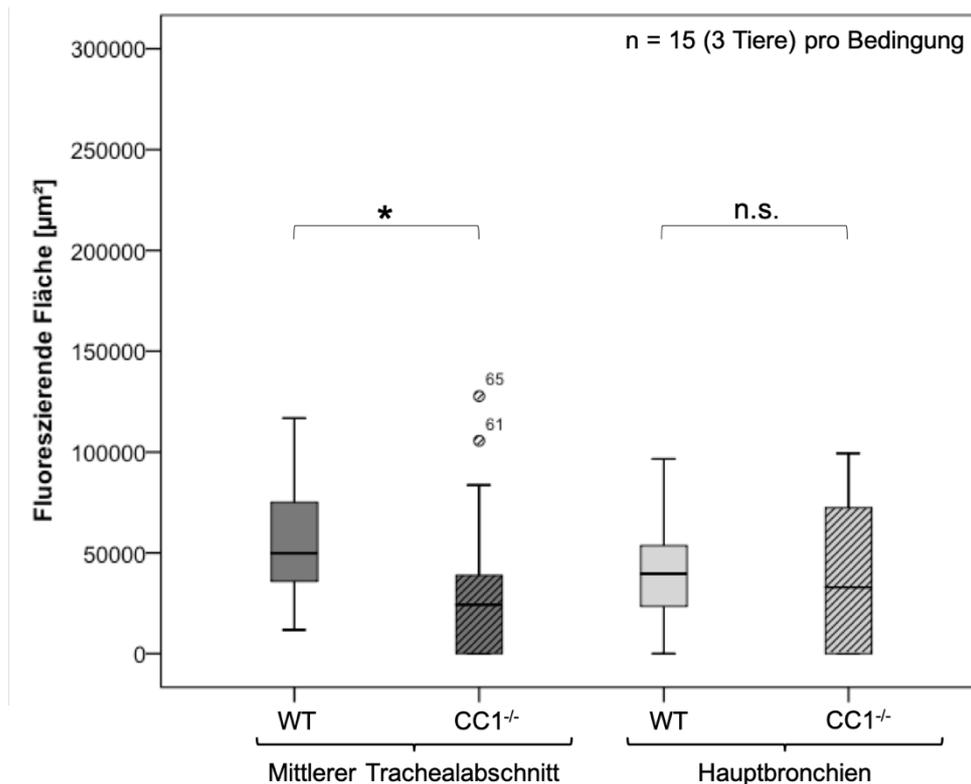


Abbildung 9: Plasmaextravasation im mittleren Trachealabschnitt (dunkelgrau) und in den Hauptbronchien (hellgrau) bei WT- und $CC1^{-/-}$ -Mäusen nach Verabreichung von PBS-Lösung. Die Fluoreszenz wurden bei einer Belichtungszeit von 55 ms (mittlerer Trachealabschnitt) bzw. 80 ms (Hauptbronchien) aufgenommen. Boxplots: Minimum (unterer Strich), Maximum (oberer Strich) und Medianwert (Strich in der Box) sowie die Perzentile 25 (unteres Ende der Box) und 75 (oberes Ende der Box). ° = Datenpunkt außerhalb der dreifachen Standardabweichung. Mann-Whitney-Test: * $p \leq 0,05$, nicht signifikant (n.s.): $p > 0,05$.

3.6 CGRP-Freisetzung

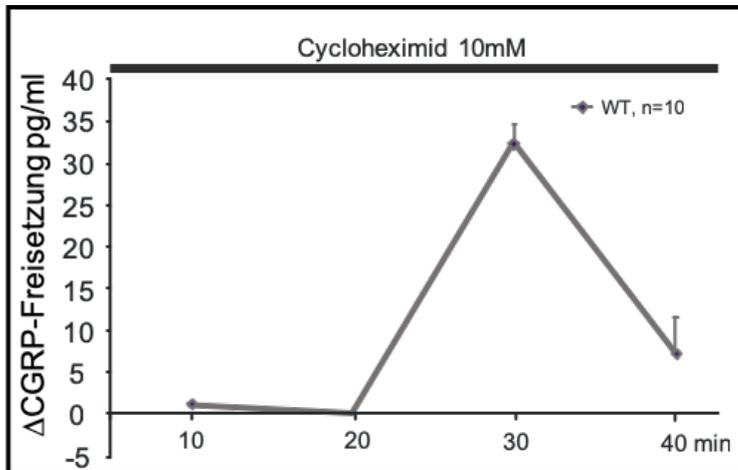


Abbildung 10: CGRP-Freisetzung nach Stimulation mit 10 mM Cycloheximid bei WT-Mäusen im Zeitverlauf.

In Versuchen unserer Arbeitsgruppe, die nicht im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, konnte eine Ausschüttung von CGRP nach Cycloheximid-Stimulation gezeigt werden (unpubliziert). Die absolute Veränderung der CGRP-Freisetzung erreichte nach 30 Minuten ihren maximalen Wert (Abb. 10).

3.7 Plasmaextravasation bei WT- und CC1^{-/-}-Mäusen nach Stimulation mit Cycloheximid im mittleren trachealen Abschnitt

WT-Mäuse zeigten bei Stimulation mit 100 μ m 1 mM und 10 mM Cycloheximid keine signifikant höhere Plasmaextravasation (Kruskal-Wallis-Test: n.s., $p = 0,908$) im mittleren Trachealabschnitt verglichen mit den Vehikelkontrollen, welche lediglich PBS-Lösung durch die Kanüle appliziert bekamen. Bei Stimulation der CC1^{-/-}-Mäusen mit 10 mM Cycloheximid zeigte sich im mittleren trachealen Abschnitt ein im Vergleich zu den Vehikelkontrollen signifikant höheres Ausmaß an Plasmaextravasation ($p = 0,037$, Abb. 11).

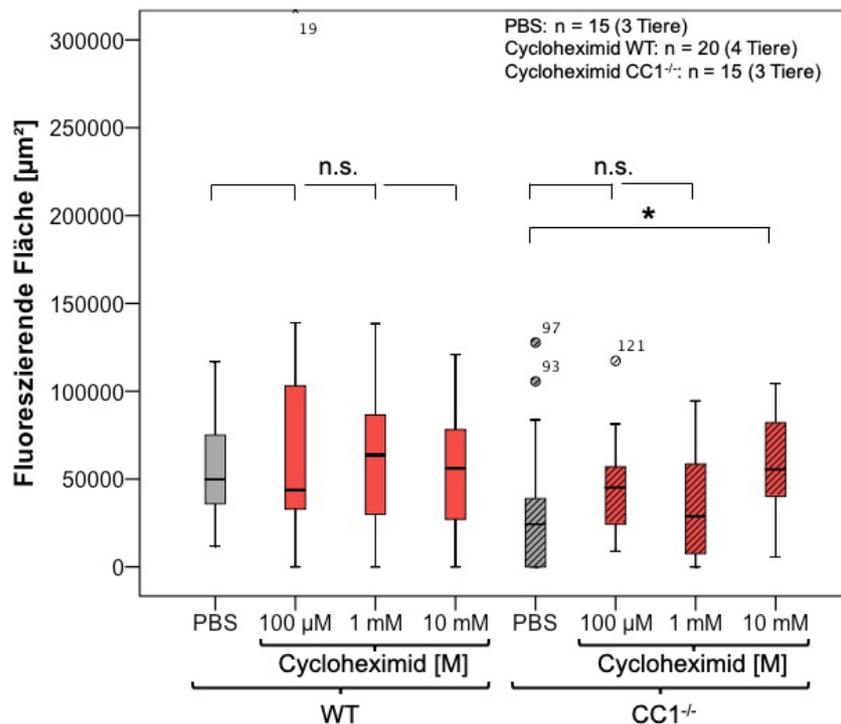
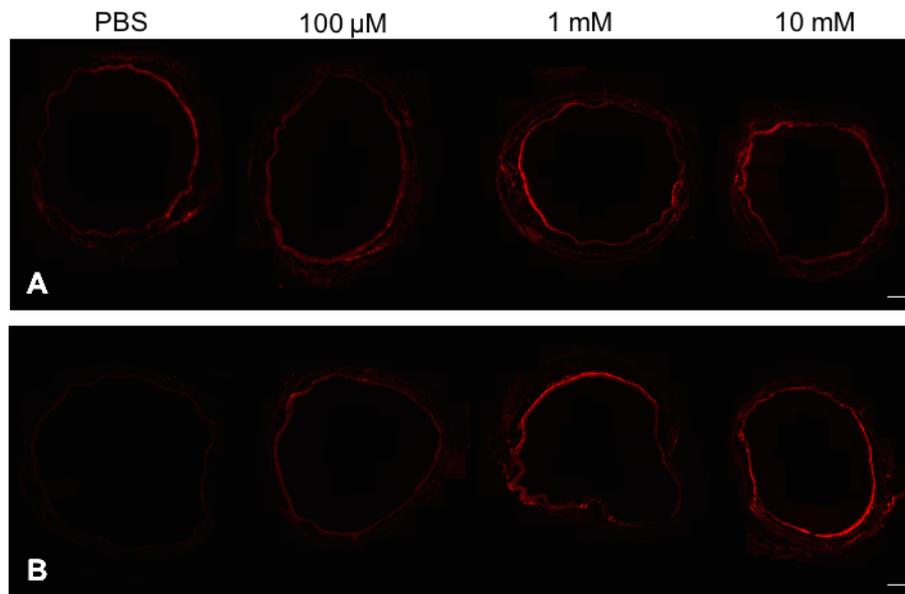


Abbildung 11: Einfluss von verschiedenen Cycloheximid-Konzentrationen auf die Plasmaextravasation in der mittleren Trachea bei WT- und CC1^{-/-}-Mäusen.

A und B: Repräsentative Aufnahmen der Fluoreszenz des Evans Blues in der mittleren Trachea von WT- (A) und CC1^{-/-}-Mäusen (B) nach Applikation von PBS-Lösung bzw. Stimulation mit 100 µM, 1 mM oder 10 mM Cycloheximid. Die Ringe wurden mit einer Belichtungszeit von 55 ms aufgenommen. Balken: 100 µm. **Boxplots:** Minimum (unterer Strich), Maximum (oberer Strich) und Medianwert (Strich in der Box) sowie die Perzentile 25 (unteres Ende der Box) und 75 (oberes Ende der Box). ° = Datenpunkt außerhalb der dreifachen Standardabweichung. Mann-Whitney-Test: *p ≤ 0,05, nicht signifikant (n.s.): p > 0,05.

3.8 Plasmaextravasation bei WT- und CC1^{-/-}-Mäusen nach Stimulation mit Cycloheximid im bronchialen Abschnitt

In WT-Mäusen zeigte sich ein signifikanter Anstieg ($p = 0,000$) der Plasmaextravasation nach Stimulation mit $100 \mu\text{M}$ im Vergleich zu einer PBS-Behandlung im bronchialen Abschnitt der Trachea. Die Gabe von 1 mM und 10 mM Cycloheximid führte zu keiner signifikanten Erhöhung der Plasmaextravasation. Die gemessene Fluoreszenz war hier vergleichbar mit der der Vehikelkontrollen ($p = 0,169$ bei 1 mM und $p = 0,755$ bei 10 mM in Abb. 12). Bei Stimulation der CC1^{-/-}-Mäuse mit 10 mM Cycloheximid zeigte sich im bronchialen Abschnitt im Vergleich zu den CC1^{-/-}-Vehikelkontrollen ein signifikant höheres Ausmaß an Plasmaextravasation ($p = 0,010$). Bei den CC1^{-/-}-Mäusen konnte eine Tendenz der Zunahme der Plasmaextravasation bei Erhöhung der Cycloheximid-Konzentration beobachtet werden (Abb. 12), jedoch war die Behandlung mit $100 \mu\text{M}$ und 1 mM nicht signifikant. Zwischen WT- und CC1^{-/-}-Mäusen konnte lediglich im bronchialen Abschnitt nach Stimulation mit $100 \mu\text{M}$ Cycloheximid ein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p = 0,001$) (Abb. 12). Die CC1^{-/-}-Mäuse zeigten in diesem Fall signifikant weniger Plasmaextravasation als Reaktion auf die Applikation des Bitterstoffes verglichen mit den WT-Mäusen (Abb. 12).

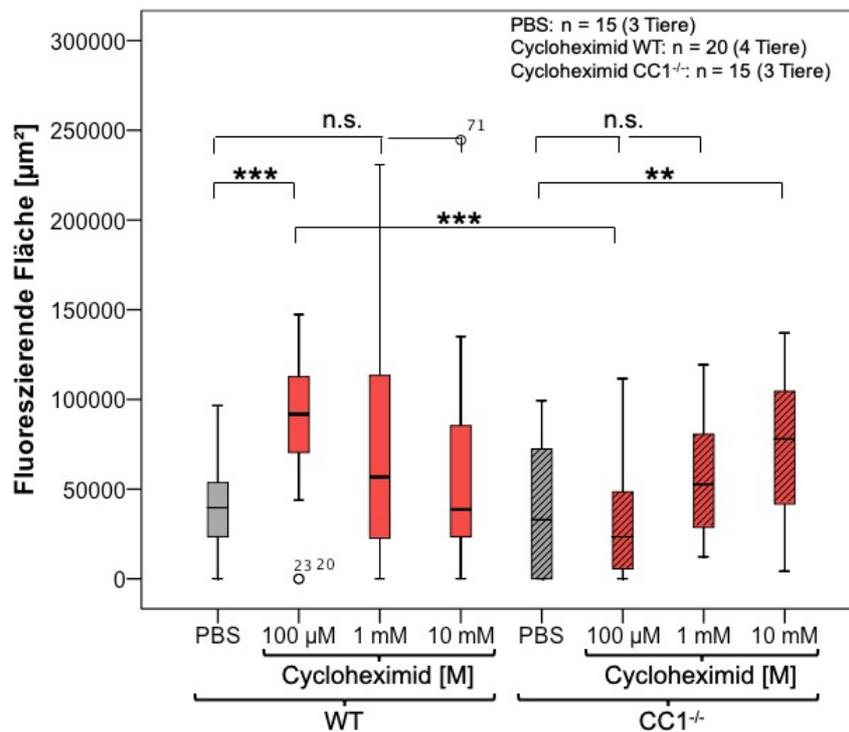
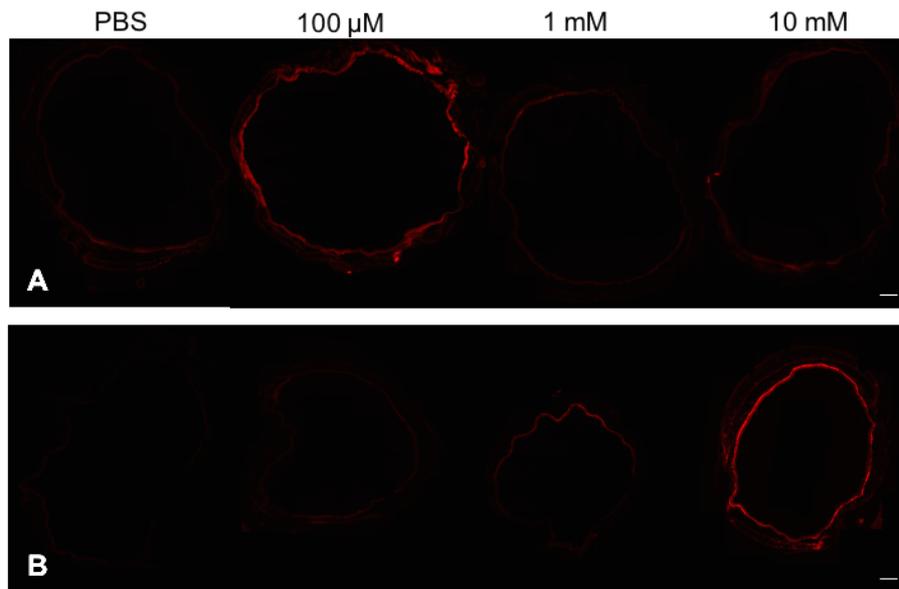


Abbildung 12: Einfluss von verschiedenen Cycloheximid-Konzentrationen auf die Plasmaextravasation in den Bronchien bei WT- und CC1^{-/-}-Mäusen.

A und B: Repräsentative Aufnahmen der Fluoreszenz des Evans Blues in den Bronchien von WT- (A) und CC1^{-/-}-Mäusen (B) nach Applikation von PBS-Lösung bzw. Stimulation mit 100 µM, 1 mM oder 10 mM Cycloheximid. Die Ringe wurden mit einer Belichtungszeit von 80 ms aufgenommen. Balken: 100 µm. **Boxplots:** Boxplots: Minimum (unterer Strich), Maximum (oberer Strich) und Medianwert (Strich in der Box) sowie die Perzentile 25 (unteres Ende der Box) und 75 (oberes Ende der Box). ° = Datenpunkt außerhalb der dreifachen Standardabweichung. Mann-Whitney-Test: **p ≤ 0,01, ***p ≤ 0,001, nicht signifikant (n.s.): p > 0,05.

3.9 Quantifizierung der zellulären Immunreaktion

3.9.1 Lokalisation der neutrophilen Granulozyten

Durch die immunhistochemische Markierung des Ly6G-Oberflächenproteins konnten neutrophile Granulozyten nachgewiesen werden. Diese wurden vorwiegend im Bereich der Knorpelspangen und seltener im Bereich der Paries membranaceus beobachtet (Klammer in Abb. 13).

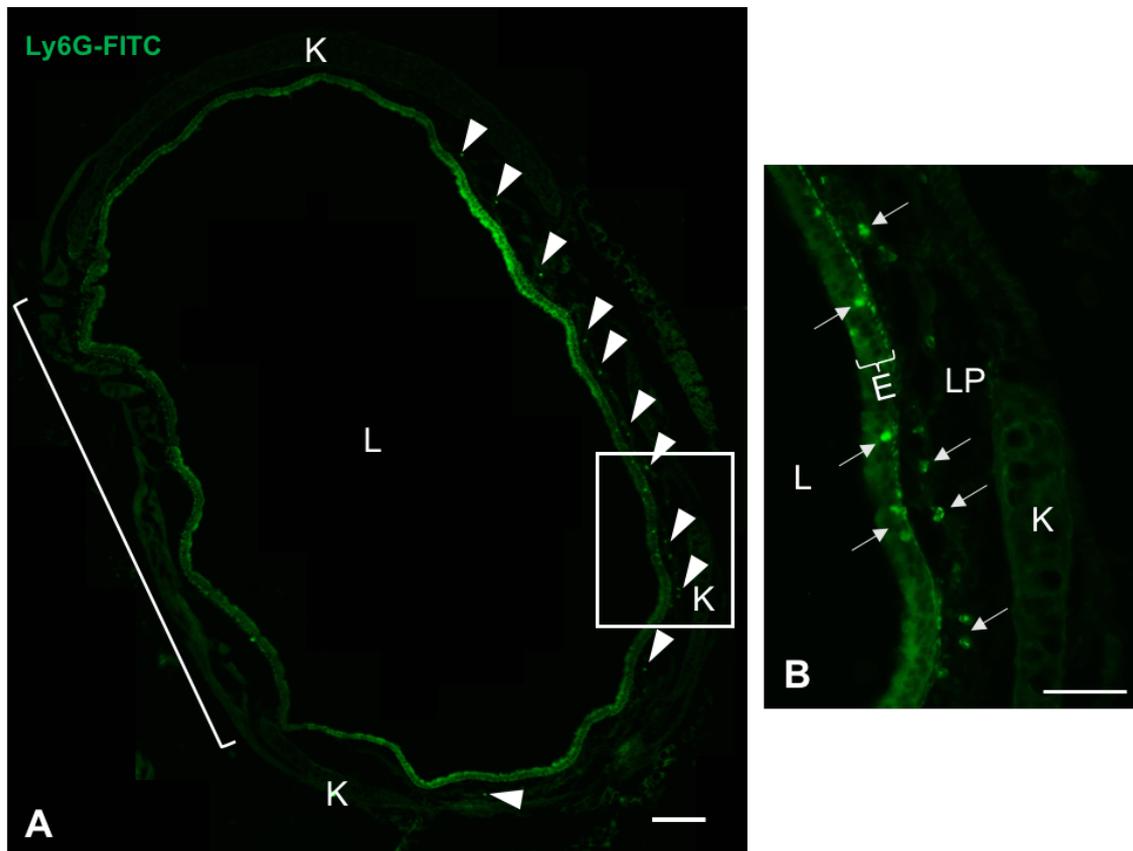


Abbildung 13: Immunhistochemie der Trachea einer $CC1^{-/-}$ -Maus nach Stimulation mit 10 mM Cycloheximid.

A: Neutrophile Granulozyten sind als grüne Pünktchen unter dem Trachealepithel zu erkennen.
B: Vergrößerung der Region markiert mit einem Viereck in A. Die Pfeile und Pfeilköpfe markieren neutrophile Granulozyten. K markiert den Trachealknorpel, L das Lumen der Trachea, E das Epithel und LP die Lamina propria. Die Klammer markiert den Bereich der Paries membranaceus.
Balken: 100 μ m (A), 50 μ m (B).

In Doppelfärbungen mit Antikörpern gegen Ly6G und CD31, welches ein spezifischer Marker für Endothelzellen ist, konnte die Lokalisation der neutrophilen Granulozyten zu den Gefäßen (intra- oder extravasal) dargestellt werden. Neutrophile Granulozyten befanden sich nach Stimulation in direkter Nähe von Gefäßen (Abb. 14).

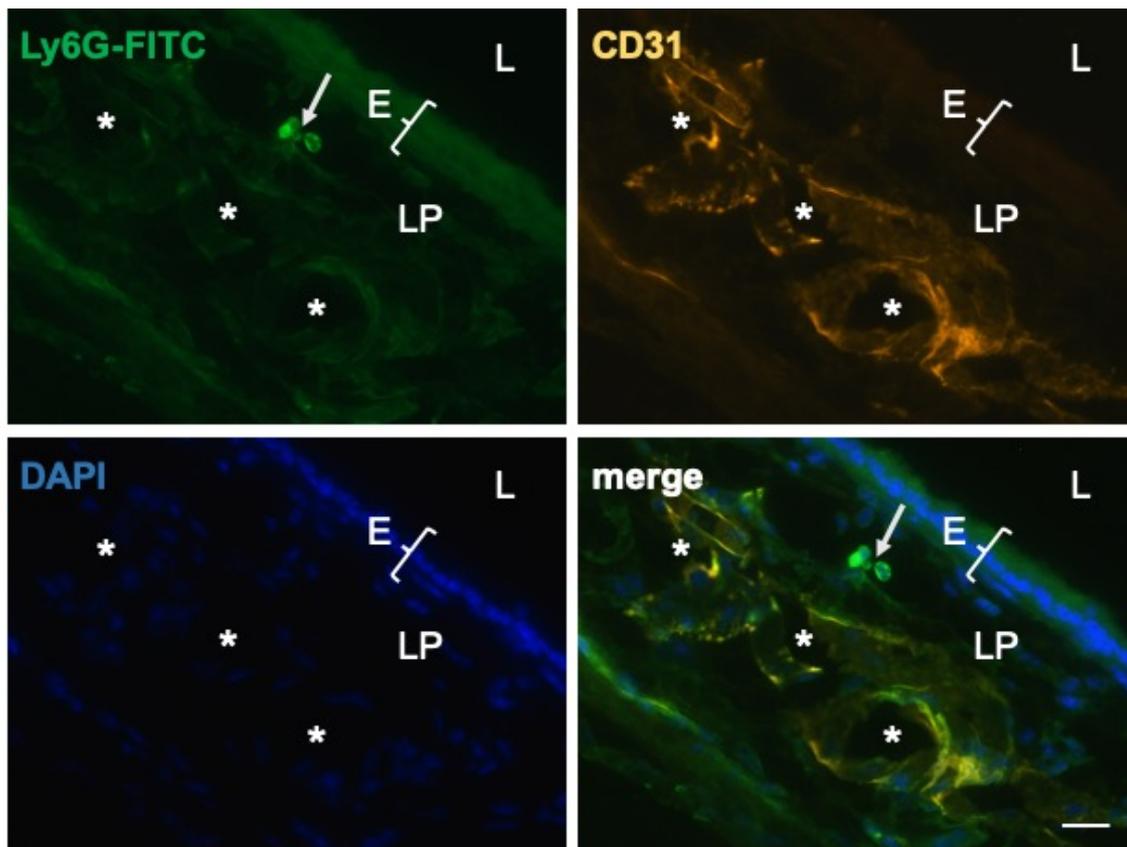


Abbildung 14: Immunhistochemie der Trachea mit Antikörpern gegen Endothelzellen (CD 31) und neutrophile Granulozyten (Ly6G-FITC).

Die Pfeile markieren neutrophile Granulozyten, E markiert das Trachealepithel, L das Lumen der Trachea, LP die Lamina propria und * markieren die Lumina von Gefäßen. Balken: 20 µm.

Die neutrophilen Granulozyten migrierten in die, an das Trachealepithel angrenzende, Lamina propria und waren auch vereinzelt im Epithel, luminal der Basalmembran, zu finden (Abb. 13).

3.9.2 Auswirkung von Cycloheximid auf die Migration neutrophiler Granulozyten

In der Statistik zum Effekt von Cycloheximid auf die Granulozytenmigration wurden intra- und extraepitheliale neutrophile Granulozyten zusammengefasst betrachtet. Wie in den Versuchen zur Plasmaextravasation wurde der kehlkopfnaher trachealer Abschnitt aus der Auswertung ausgeschlossen. Der Bereich der Knorpelspangen 6-11 repräsentierte den trachealen Abschnitt der Atemwege, der Bereich unterhalb des 12. Trachealknorpels den bronchialen Abschnitt der Atemwege. Im trachealen Bereich ergab die Auszählung der neutrophilen Granulozyten bei den WT-Mäusen einen hoch signifikanten Anstieg ($p = 0,000$) der Migration bei 100 μM und 1 mM Cycloheximid. Bei Stimulation mit 10 mM Cycloheximid zeigte die Migration neutrophiler Granulozyten einen signifikanten Anstieg verglichen mit den Vehikelkontrollen ($p = 0,005$). Die CC1^{-/-}-Mäuse zeigten nur bei Verabreichung der höchsten Konzentration eine signifikant erhöhte ($p = 0,001$) Migration neutrophiler Granulozyten im Vergleich zu den Vehikelkontrollen (Abb. 15). Die Stimulation mit 100 μM Cycloheximidlösung verursachte bei WT-Mäusen eine signifikant stärkere ($p = 0,019$) Granulozytenmigration als bei CC1^{-/-}-Mäusen (Abb. 15).

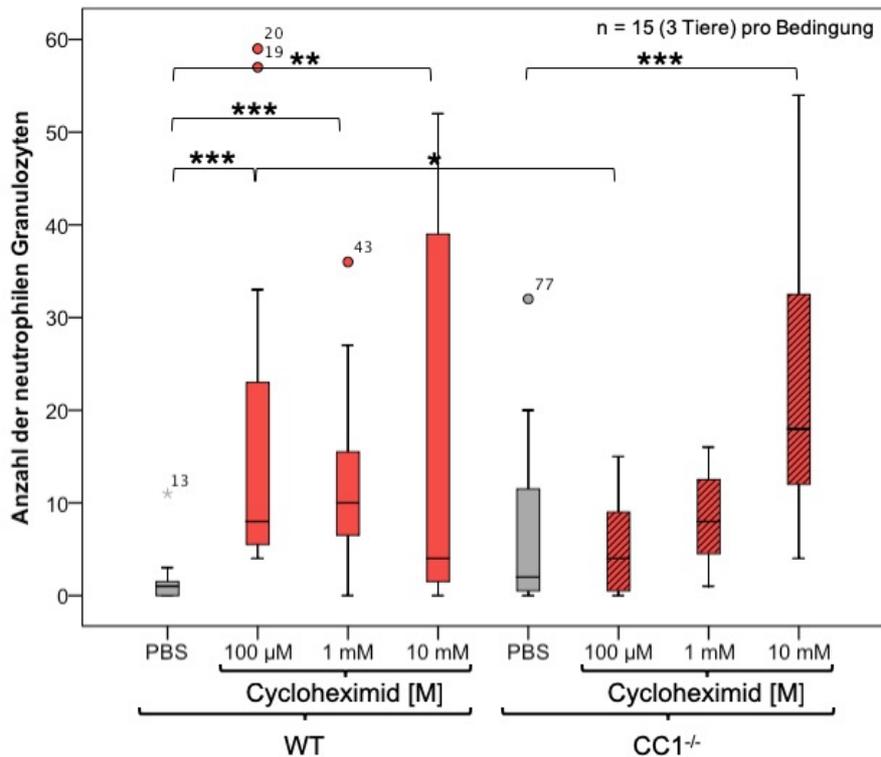


Abbildung 15: Anzahl der neutrophilen Granulozyten im trachealen Abschnitt bei WT- und CC1^{-/-}-Mäusen (schraffiert) nach Verabreichung von Cycloheximid in den Konzentrationen 100 µm, 1 mM 10 mM und PBS (grau) als Vehikel-Kontrolle.

Mann-Whitney-U-Test: ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, ° = Datenpunkte außerhalb der dreifachen Standardabweichung. Boxplots: Minimum (unterer Strich), Maximum (oberer Strich) und Medianwert (Strich in der Box) sowie die Perzentile 25 (unteres Ende der Box) und 75 (oberes Ende der Box).

Im bronchialen Bereich kam es bei den WT-Mäusen nach Stimulation mit 100 µM ($p = 0,041$) und 1 mM ($p = 0,000$) Cycloheximid zu einem signifikanten Anstieg der Granulozytenmigration (Abb. 16). Bei Verabreichung von 10 mM Cycloheximid ist ein signifikanter Rückgang der Migration zu beobachten ($p = 0,045$, Abb. 16). Der Mittelwert der migrierten neutrophilen Granulozyten lag in diesem Fall sogar unterhalb des Mittelwertes der Vehikel-Kontrollen. Die CC1^{-/-}-Mäuse zeigten, wie im trachealen Abschnitt, lediglich bei Stimulation mit 10 mM einen signifikanten Anstieg ($p = 0,000$) der Granulozytenmigration. Im bronchialen Abschnitt zeigten die CC1^{-/-}-Mäuse ein im Vergleich zu den WT-Mäusen geringeres Ausmaß an Migration von neutrophilen Granulozyten nach Stimulation mit 1 mM Cycloheximid ($p = 0,000$) (Abb. 16).

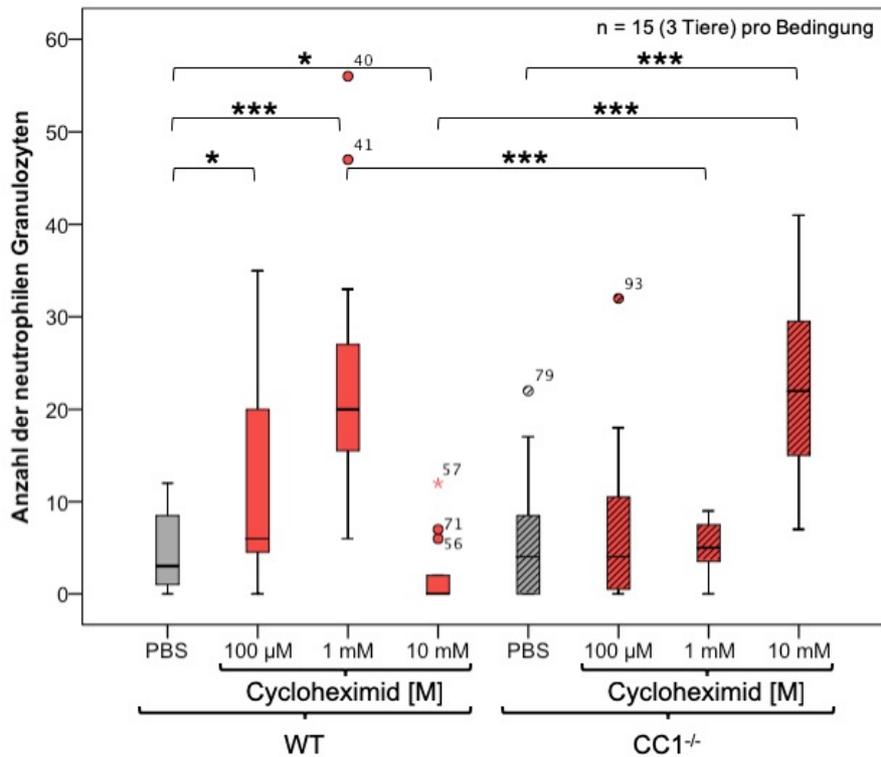


Abbildung 16: Anzahl der neutrophilen Granulozyten im bronchialen Abschnitt bei WT und CC1^{-/-}-Mäusen (schraffiert) nach Verabreichung von Cycloheximid in den Konzentrationen 100 µM, 1 mM 10 mM und PBS (grau) als Vehikel-Kontrolle.

Mann-Whitney-U-Test: *p ≤ 0,05, ***p ≤ 0,001, ° = Datenpunkte außerhalb der dreifachen Standardabweichung. Boxplots: Minimum (unterer Strich), Maximum (oberer Strich) und Medianwert (Strich in der Box) sowie die Perzentile 25 (unteres Ende der Box) und 75 (oberes Ende der Box).

Tabelle 6 ist eine Zusammenfassung der mittleren Anzahl migrierter neutrophiler Granulozyten im trachealen und bronchialen Abschnitt jeweils nach Verabreichung von Cycloheximid in drei Konzentrationen bzw. nach Verabreichung von PBS. Dabei wurde zwischen intraepithelial und extraepithelial lokalisierten neutrophilen Granulozyten unterschieden. Extraepithelial lagen die Mittelwerte für die Anzahl der Neutrophilen in den jeweiligen Gruppen mit 1,47 - 21,2 deutlich höher als intraepithelial, wo die Mittelwerte lediglich zwischen 0,13 und 3,33 lagen (Tab. 6).

Tabelle 6: Mittelwerte der gezählten neutrophilen Granulozyten.

Mittelwert = MW, SD = Standardabweichung

| | Bereich | Mittelwert extraepithelial | | Mittelwert intraepithelial | |
|---|---------------|----------------------------|------------------------|----------------------------|--------------------|
| | | C57BL/6J | CC1 ^{-/-} | C57BL/6J | CC1 ^{-/-} |
| PBS MW ± SD Median | T6-11 | 1,47 ± 2,8 1 | 6,47 ± 9,06 2 | 0,43 ± 1,12 0 | 0,47 ± 1,13 0 |
| | T12- Hilum | 3,93 ± 3,81 3 | 5,27 ± 6,33 3 | 0,47 ± 0,74 0 | 0,53 ± 0,99 0 |
| 100 µM Cycloheximid MW ± SD Median | T6-11 | 15,6 ± 15,4 8 | 5,27 ± 4,96 4 | 2,00 ± 3,25 1 | 0,27 ± 0,59 0 |
| | T12- Hilum | 9,00 ± 8,48 6 | 6,87 ± 9,1 4 | 2,67 ± 3,64 0 | 0,27 ± 0,59 0 |
| 1 mM Cycloheximid MW ± SD Median | T6-11 | 11,07 ± 8,61 9 | 7,20 ± 4,26 8 | 1,00 ± 1,56 1 | 0,67 ± 1,29 0 |
| | T12- Hilum | 21,0 ± 12,07 19 | 4,87 ± 2,64 5 | 2,6 ± 2,23 2 | 0,53 ± 0,74 0 |
| 10 mM Cycloheximid MW ± SD Median | T6-11 | 14,6 ± 17,11 4 | 21,2 ± 13,99 17 | 2,27 ± 3,63 0 | 1,87 ± 2,3 2 |
| | T12- Hilum | 1,93 ± 3,37 0 | 18,73 ± 10,15 18 | 0,13 ± 0,35 0 | 3,33 ± 1,84 3 |

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Methode etabliert, neurogene Entzündung anhand der Veränderung der vaskulären Permeabilität sichtbar zu machen und zu quantifizieren. Eine neurogene Entzündungsreaktion geht mit einer Erhöhung der vaskulären Permeabilität einher. Als messbare Parameter wurden die Plasmaextravasation und die Entzündungszellmigration herangezogen. Die Regulierung der Permeabilität in den verschiedenen Gefäßabschnitten ist von großer Bedeutung, da sich das Gewebe so vor dem unerwünschten Übertritt schädlicher Stoffe und Entzündungszellen in das Gewebe schützt (Giannotta et al., 2013). Die Entzündungsreaktion als Folge einer Aktivierung sensorischer Nervenendigungen ist am besten in der Haut beschrieben. Nicholas Jancsó prägte den Begriff neurogene Entzündung. Er entdeckte, dass nicht nur Vasodilatation, sondern auch erhöhte Permeabilität durch einen Stimulus ausgelöst werden können. Von ihm wurde zum ersten Mal Evans Blue zur Quantifizierung von Plasmaextravasation eingesetzt (Jancsó, 1960; Jancsó et al., 1967; Jancsó, Jancsó-Gabor, & Szolcsanyi, 1968; Baluk, 1997).

4.1 Diskussion des Versuchsmodells

4.1.1 CC1^(-/-)-Mäuse als Modell für eine gestörte endotheliale Barriere und überschießende Immunantwort

Ab einem Alter von 12 Wochen gelten C57BL/6J-Mäuse als erwachsen, sodass man von einem vollständig entwickelten Respirationstrakt und Immunsystem ausgehen kann. Die Entwicklung des respiratorischen Systems ist mit der Geburt nicht abgeschlossen, sondern findet auch noch nach der Geburt statt. Für die *in vivo* Versuche wurden daher bewusst Mäuse im Alter von über 12 Wochen ausgewählt. Die für die *in vivo* Versuche verwendeten CC1^(-/-)-Mäuse hatten C57BL/6J-Mäuse als genetischen Hintergrund. Die Generierung der CC1^(-/-)-Mäuse erfolgte durch die Arbeitsgruppe Leung und Mitarbeiter (2006). Zur

Unterbindung der CEACAM1-Expression wurden die ersten zwei Exons des CEACAM1-Gens entfernt. Im Bereich des ersten Exons ist das Initiatorcodon ATG kodiert, welches zusammen mit der auf Exon 2 kodierten Ig-ähnlichen Domäne wichtig für Transkription und Funktion des Proteins ist. Exon 1 und 2 des CEACAM1-Gens wurden durch eine Genkassette ersetzt. Die Strategie führt zu einer Inaktivierung des CEACAM1-Gens in homozygoten Mäusen, was laut der Arbeitsgruppe eine komplette Unterbindung der CEACAM1-Transkription zur Folge hat (Leung et al., 2006). Es handelt sich bei den in diesem Versuch verwendeten Mäusen also um konditionelle Knockoutmäuse, die kein Restprotein mehr exprimieren (Leung et al., 2006). CC1^{-/-}-Mäuse zeigen hinsichtlich Größe und Aufzweigungshäufigkeit von Blutgefäßen keine Unterschiede zu WT-Mäusen. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten jedoch Anomalitäten im subendothelialen Aufbau der Aorta sowie im ultrastrukturellen Aufbau dermalen Mikrogefäße. Diese Veränderungen deuten auf eine generelle Beeinflussung der vaskulären Integrität durch CEACAM1-Defizienz hin (Nouvion et al., 2010). CC1^{-/-}-Mäuse weisen Defizite in der Gefäßformierung und Kollateralenbildung auf (Horst et al., 2006) sowie eine signifikant erhöhte basale vaskuläre Permeabilität (Nouvion et al., 2010) und eine verstärkte Leukozyteninteraktion mit dem Endothel (Ghavampour et al., 2018). In Erwartung eines besonders starken Effektes bezüglich der Plasmaextravasation und Leukozytenmigration, erscheint dieser Mausstamm für die Etablierung einer Methode zur Messung vaskulärer Permeabilität besonders geeignet.

Bezüglich der Stimulation mit Cycloheximid ist zu beachten, dass es Cycloheximid-Taster und non-Taster Mäuse gibt, die jeweils unterschiedliche Allele für den Tas2R105 besitzen (Chandrashekar et al., 2000). Da die in den Versuchen verwendeten Mäuse alle den gleichen C57BL/6J-Hintergrund aufwiesen, ist von keiner Beeinflussung der Ergebnisse in dieser Arbeit auszugehen.

4.1.2 Untersuchung der endothelialen Barrierefunktion

Donald McDonald und Kollegen beschrieben verschiedene Methoden zur Untersuchung von endothelialen Veränderungen im Verlauf einer neurogenen Entzündungsreaktion. Sie konnten zeigen, dass Spalten im Endothel tatsächlich im Zuge der Veränderung der Gefäßpermeabilität auftreten und dass sie kein Artefakt der Fixierung mit Paraformaldehyd sind. Die Formierung endothelialer Spalten und das Einsetzen von Plasmaaustritt erfolgt in weniger als einer Minute nach Stimulation (McDonald, 1994; McDonald, Thurston, & Baluk, 1999). Ziel dieser Arbeit waren die Quantifizierung und die Bestimmung der Lokalisation von Epithel-vermittelter Plasmaextravasation anhand des ins Gewebe übergetretenen plasmagebundenen Evans-Blue-Farbstoffes. Evans Blue ist ein synthetischer Farbstoff aus der Gruppe der Azofarbstoffe (Mortimer & Müller, 2007), der aufgrund seiner Eigenschaft, sich innerhalb von Sekunden an das Plasmaprotein Albumin zu binden, gut zur Quantifizierung von Plasmaextravasation in den Atemwegen geeignet ist (Saria & Lundberg, 1983). Evans Blue verursacht eine starke Blaufärbung des Gewebes, die makroskopisch und lichtmikroskopisch am Präparat zu erkennen ist. Zudem weist der Farbstoff bei einer Lichtwellenlänge von 585 nm Fluoreszenz auf und kann, wie im Zuge dieser Dissertation, mittels Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden (Matsuda, Nishikawa, & Tanaka, 1995). Eine weitere Möglichkeit ist die Quantifizierung durch Spektrometrie, bei der entweder Serum (Brown, Mitar, & Whitworth, 1992) oder homogenisiertes Gewebe (Oztas, Kaya, & Camurcu, 1992) analysiert werden kann. Ein Problem stellt hierbei die Färbung des Gewebes, zum einen durch die direkte Bindung von freiem Farbstoff im Gewebe und zum anderen durch die Anwesenheit von mit Farbstoff konjugiertem Albumin im Gefäßsystem, dar (Clasen, Pandolfi, & Hass, 1970). Es wurde vermutet, dass Evans Blue durch die Formierung von Wasserstoffbindungen zwischen der Azo-Gruppe des Farbstoffes und der Wasserstoffgruppe der Gewebepolysaccharide im Gewebe bindet (Clasen et al., 1970). Für eine korrekte Auswertung der durch bakterielle Stoffe induzierten Plasmaextravasation war es uns wichtig, das Evans Blue aus dem Gefäßsystem auszuwaschen, gleichzeitig

aber den durch die Plasmaextravasation ins Gewebe gelangten Farbstoff zu fixieren. Bei einer Immersionsfixierung wäre der intravasale Farbstoff mit fixiert worden, daher war die Perfusion des kompletten Versuchstieres die Methode der Wahl. Bei der Spülung des vaskulären Systems war es entscheidend, keine zusätzliche Ausschwemmung des Evans Blues zu verursachen. Die Verwendung von physiologischer Kochsalzlösung, die keine Proteine enthält, hätte zu einer Verminderung der Proteinkonzentration intravasal geführt, was einen Übertritt des Evans Blues ins Gewebe zur Folge gehabt hätte. PVP MG 40.000 ist für seine plasmaähnlichen Eigenschaften bekannt und eignete sich daher gut zur Spülung des vaskulären Systems (Reppe, 1953). Bei der Aufbereitung der Präparate war es wichtig, einerseits eine gute histologische Struktur für die Mikroskopie zu erhalten, andererseits das Evans Blue nicht aus dem Gewebe auszuwaschen. Ein schnelles Einfrieren der Präparate in flüssigem Stickstoff hätte zu einer Rissbildung durch zu schnellen Temperaturabfall geführt. Daher wurden die Präparate max. 19-22 Stunden in 20% Saccharose inkubiert.

4.1.3 Lokalisation und Auswertung der Plasmaextravasation

Durch die Auswertung von Gewebeschnitten konnte die Plasmaextravasation genau lokalisiert werden. Anders als bei photometrischen Auswertungen von Evans Blue, wo das Gewebe homogenisiert wird, ist es bei dieser Methode möglich, die genaue Lokalisation des Extravasationsvorgangs darzustellen. Auch die Granulozyten waren durch die Verwendung von Kryoschnitten beim Austritt aus den Gefäßen gut darstellbar, sodass zwischen extra- und intraepithelial lokalisierten neutrophilen Granulozyten unterschieden werden konnte. Zur quantitativen Auswertung ergaben sich verschiedene Möglichkeiten:

Bei Auswahl des ganzen Trachealrings und ausschließlicher Messung der Fluoreszenzintensität in dieser Fläche war zu bedenken, dass die Trachealringe Unterschiede in ihrer Größe aufwiesen, was dieses Vorgehen ausschloss. Hieraus ergab sich die Überlegung, die Fluoreszenzintensität pro fluoreszierende Fläche zu bestimmen. Die Betrachtung der Werte spiegelte bei dieser Vorgehensweise jedoch nicht die im Mikroskop sichtbaren Unterschiede wider.

Es stellte sich heraus, dass sich nicht die Intensität der Fluoreszenz zwischen den einzelnen Präparaten unterschied, sondern die Größen der fluoreszierenden Bereiche variierten. Zur Quantifizierung der nach Stimulation durch Cycloheximid aufgetretenen Plasmaextravasation wurde die fluoreszierende Fläche gemessen und ausgewertet. Als Kontrolle wurden Mäuse verwendet, die nach dem gleichen Protokoll behandelt wurden und lediglich statt Cycloheximid das gleiche Volumen vom Vehikel erhielten. Die funktionellen Anforderungen an das respiratorische Epithel verändern sich im Verlauf der Atemwege. Sie reichen von der Erwärmung und Befeuchtung der Luft über die Erfassung von größeren Fremdpartikeln und immunologischen Funktionen bis zur Gewährleistung des Gasaustauschs. Dieses breite Aufgabenspektrum erfordert eine, sich im Verlauf der Atemwege ändernde, Beschaffenheit und Prädominanz der Zellen des respiratorischen Epithels. Die morphologischen Unterschiede der Trachealabschnitte lassen eine unterschiedliche Reaktion auf Stimulation vermuten. Hinsichtlich ihres histologischen Aufbaus repräsentiert die Trachea der Maus den größten Teil der menschlichen Atemwegsabschnitte einschließlich der Lunge (Rock et al., 2010). Die Maustrachea ähnelt histologisch den großen Bronchien beim Menschen, während die Bronchien der Maus in ihrem Wandaufbau den tiefen, pulmonalen Abschnitten der menschlichen Atemwege, den Bronchioli, am nächsten kommen (Rock et al., 2010). Da in der vorliegenden Arbeit Trachea und Hauptbronchien der Maus untersucht wurden, können die Ergebnisse vom trachealen Atemwegsabschnitt als repräsentativ für die extrapulmonalen Abschnitte beim Menschen und die Ergebnisse vom bronchialen Atemwegsabschnitt der Versuchstiere als repräsentativ für die intrapulmonalen Atemwegsabschnitte der Bronchien beim Menschen gesehen werden. Es konnte gezeigt werden, dass ab dem Trachealknorpel 6 bis zum Lungenhilum die entzündungsbedingte Plasmaextravasation ohne Verfälschung durch die eingebrachte Kanüle quantifizierbar ist. Möglicherweise kam es durch das Einbringen der Kanüle im Kehlkopfnahen Abschnitt der Trachea zur Schädigung des Epithels und zur Stimulation der im Epithel vorkommenden sensorischen Nervenendigungen. Die Versuchstiere, die lediglich eine Kanüle ohne anschließende PBS Applikation gesetzt bekamen, zeigten keine Erhöhung der Plasmaextravasation. Der

mechanische Reiz scheint somit nicht entscheidend zu sein, da erst die eingebrachte PBS-Lösung an der zuvor entstandenen Wunde zu einer Plasmaextravasation geführt hatte. In den anderen Abschnitten lag ein intaktes Epithel vor, das durch die PBS-Lösung nicht gereizt wurde. Dieser starke Unterschied zwischen dem kehlkopfnahen Trachealabschnitt und den restlichen Atemwegsabschnitten, die nicht mit der Kanüle in Berührung kamen, kann auch als ein Beleg dafür gesehen werden, dass die Methode in der Lage ist, einen auf das Epithel einwirkenden Reiz zu detektieren.

4.2 Plasmaextravasation in den unterschiedlichen Atemwegsabschnitten

Die Gegenüberstellung der trachealen und bronchialen Atemwegsabschnitte zeigt, dass die Plasmaextravasation nach Verabreichung von PBS und 100 μ M Cycloheximid in WT- und CC1^{-/-}-Mäusen im bronchialen Abschnitt geringer als im trachealen Abschnitt war. Es ist nicht auszuschließen, dass dieses Ergebnis auch durch eine zu geringe Belichtungszeit für die Bronchialabschnitte beeinflusst wurde. Um die Atemwegsabschnitte miteinander vergleichen zu können, wurden alle Präparate mit einer einheitlichen Belichtungszeit ausgewertet. Die Präparate wurden bei einer möglichst niedrigen Belichtungszeit aufgenommen, um die Messergebnisse durch eine Überbelichtung in verschiedenen Atemwegsabschnitten nicht zu verfälschen. Die Präparate der trachealen Abschnitte zeigen eine deutlich stärkere Fluoreszenz als die Präparate der Bronchien, wodurch die optimale Belichtungszeit für den Dosis-Wirkung-Vergleich von Cycloheximid in den verschiedenen Atemwegsabschnitten unterschiedlich festgelegt werden musste. Die einheitliche Belichtungszeit betrug 45 ms. Die optimierten Belichtungszeiten lagen für den kehlkopfnahen trachealen Abschnitt bei 45 ms, für den mittleren trachealen Abschnitt bei 55 ms und für den bronchialen Abschnitt bei 80 ms. Die große Differenz zwischen der einheitlichen und der optimierten Belichtungszeit für den bronchialen Abschnitt deutet auf eine schwächer ausfallende Entzündungsreaktion in den Bronchien, verglichen mit dem trachealen

Atemwegsabschnitt, hin. Der Grund dafür könnte die nach distal abnehmende Dichte von Bürstenzellen sein (Tizzano et al., 2011). Bei einer geringeren Dichte von chemosensorischen Zellen, die in der Lage sind durch Cycloheximid-Stimulation eine Entzündungsreaktion auszulösen, würde sich entsprechend eine in den Atemwegen nach distal abnehmende Plasmaextravasation zeigen.

4.3 Basale Permeabilität bei Endotheldefekt

Es konnte bereits in verschiedenen Arbeiten gezeigt werden, dass die CEACAM-1-Defizienz zu einer Erhöhung der basalen endothelialen Permeabilität in der Aorta (Najjar et al., 2013; Ghavampour et al., 2018) sowie in Haut, Niere und Lunge (Nouvion et al., 2010) führt. Die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit deuten interessanterweise darauf hin, dass das Fehlen des CEACAM1-Rezeptors die Permeabilität des Endothels in trachealen postkapillären Venolen signifikant verringert. Dieses Ergebnis lässt eine gefäßabschnittsspezifische Wirkung des CEACAM1-Rezeptors auf die endotheliale Permeabilität vermuten. Während die Anwesenheit des Moleküls im aortalen Endothel dessen Permeabilität verringert, wirkt es in trachealen postkapillären Venolen vielleicht permeabilitätsfördernd, was der physiologischen Funktion dieses Gefäßabschnittes entsprechen würde. Die Literatur zeigt, dass CEACAM1 die endotheliale Permeabilität über verschieden Wege beeinflusst. CEACAM1 spielt eine Rolle bei der Formierung von Adhärenzkontakten. Als Ursache der erhöhten basalen Permeabilität der Aorta (Najjar et al., 2013) und kleiner Blutgefäße der Haut (Nouvion et al., 2010) wird eine verminderte Stabilität der Adhärenskontakte bei CC1^{-/-}-Mäusen vermutet (Nouvion et al., 2010; Najjar et al., 2013). Im Bereich endothelialer Adhärenskontakte sind benachbarte Zellen über VE-Cadherin verknüpft. Bei CC1^{-/-}-Mäusen konnte eine gestörte Ausbildung dieser Kontakte gezeigt werden (Nouvion et al., 2010; Najjar et al., 2013; Ghavampour et al., 2018). Des Weiteren führen Unterschiede in Tyrosin-Phosphorylierung und Expression von Caveolin-1, einem membranständigen Regulator- und Transportprotein, zu einer Destabilisierung der Adhärenskontakte mit Zunahme der endothelialen Permeabilität bei CC1^{-/-}-Mäusen (Sun, Hu, Zhang, & Minshall, 2009). CEACAM1-

Defizienz führt zum Ausbleiben der Stickstoffmonoxid (NO)-Synthese nach Bindung von VEGF an den VEGFR-2. VEGF erhöht die Permeabilität, NO wirkt hingegen permeabilitätssenkend, was bei einer verminderten Synthese im Falle einer CEACAM1-Defizienz ebenfalls zu einer Permeabilitätssteigerung führt (Nouvion et al., 2010). Diese, aus der Literatur bekannten, durch CEACAM1 regulierten Mechanismen, führen bei CEACAM1-Defizienz zu einer Steigerung der basalen endothelialen Permeabilität. Über die genaue Regulierung der Permeabilität im Gefäßsystem des Trachealepithels ist noch zu wenig bekannt, um eine Begründung für die verminderte basale Permeabilität bei CEACAM1-Defizienz, die in dieser Arbeit gezeigt wurde, zu geben. Die Messung der Plasmaextravasation nach Evans-Blue-Injektion durch die Arbeitsgruppe von Nouvion und Mitarbeitern (2010) wurde photometrisch durchgeführt. Die basale Plasmaextravasation im Gewebe von Lunge, Nieren und Ohren der Mäuse war insgesamt erhöht, es wurde jedoch nicht bezüglich der Gefäßabschnitte differenziert. Eine nähere Untersuchung der endothelialen Zell-Zell-Kontakte bei CEACAM1-Defizienz in trachealen postkapillären Venolen könnte in Zukunft interessant sein.

4.4 Provokation einer neurogenen Entzündungsreaktion

Als ein bakterieller Bitterstoff, der von einem Bodenbakterium produziert wird, ist der Kontakt von Cycloheximid mit den Atemwegen von Mäusen gut denkbar. Die Anwendung der Substanz zur Überprüfung der Hypothese, dass bakterielle Substanzen in der Lage sind, in den unteren Atemwegen von Mäusen eine neurogene Entzündung zu induzieren, ist somit schlüssig. Wir konnten zeigen, dass Cycloheximid als Stimulans in der Lage ist, eine CGRP-Freisetzung zu provozieren. Das in dieser Arbeit etablierte Versuchsmodell misst keine Peptidkonzentrationen, sondern stellt einen funktionellen Nachweis der Peptide über die Quantifizierung der neurogenen Entzündungsreaktion dar. Die Quantifizierung der Entzündungsreaktion durch Messung der Fluoreszenz im histologischen Schnitt stellt eine sensitive Methode dar, die die Detektion von 100 μ M Cycloheximid oder sogar weniger ermöglicht. Neben der Extravasation von

Plasmaproteinen kommt es bei einer Entzündungsreaktion zur Migration von Entzündungszellen. Somit stellt auch die Anzahl der eingewanderten Immunzellen einen weiteren Parameter dar, der zur Quantifizierung der Entzündungsreaktion genutzt werden kann. Da neutrophile Granulozyten den Großteil der Leukozyten darstellen und besonders schnell am Ort der Entzündung erscheinen, eignen sie sich gut zur Repräsentation der zellulären Immunantwort. Das Ly6G-Protein ist ein spezifischer Oberflächenmarker für neutrophile Granulozyten. Daher wurde ein Antikörper gegen dieses Protein zur Markierung von neutrophilen Granulozyten in unseren Versuchen genutzt (Lee et al., 2013). Die Stimulation mit 100 μ M Cycloheximid löst bei WT-Mäusen im bronchialen Abschnitt einen signifikanten Anstieg der Plasmaextravasation aus. Im trachealen Abschnitt kann keine erhöhte Plasmaextravasation durch Cycloheximid-Stimulation beobachtet werden. Bezüglich der Entzündungszellmigration kann durch Cycloheximid ebenfalls eine Entzündungsreaktion ausgelöst werden. WT-Mäuse zeigen im trachealen Abschnitt einen signifikanten Anstieg der Migration neutrophiler Granulozyten bei allen verabreichten Cycloheximid-Konzentrationen. Im bronchialen Abschnitt verursacht nur die Stimulation mit 100 μ M und 1 mM Cycloheximid einen signifikanten Anstieg der Granulozytenmigration. Im Gegensatz zum Wildtyp kommt es bei CC1^{-/-}-Mäusen sowohl im trachealen als auch im bronchialen Abschnitt bei Applikation von 10 mM Cycloheximid zu einer signifikanten Erhöhung der Plasmaextravasation. Sowohl das Tracheal- als auch das Bronchialepithel reagieren auf das Stimulanz mit einer erhöhten Plasmaextravasation. Auch die Migration von neutrophilen Granulozyten zeigt, nach Applikation der höchsten Konzentration im trachealen und bronchialen Atemwegsabschnitt von CC1^{-/-}-Mäusen, einen signifikanten Anstieg. Das Stimulans ist offensichtlich in der Lage, eine Immunantwort in Form von Plasmaextravasation und Leukozytenmigration zu provozieren, die sich durch das in dieser Arbeit etablierte Versuchsmodell quantifizieren lässt. Erst durch die Stimulation mit Cycloheximid in höheren Dosen zeigen die CC1^{-/-}-Mäuse bezüglich der Plasmaproteine ein Permeabilitätslevel ähnlich dem der Wildtypmäuse, woraus sich eine höhere Wirkschwelle für Cycloheximid bei CC1-

^{-/-}-Mäuse ableiten lässt. WT-Mäuse scheinen sensibler auf das Stimulans zu reagieren, da bereits niedrige Konzentrationen eine Wirkung erzielen. Bezüglich der Entzündungszellmigration kann im bronchialen Abschnitt der WT-Mäuse sogar ein Wirkmaximum bei Verabreichung von 1 mM Cycloheximid beobachtet werden. Betrachtet man die Mittelwerte der Migration bei WT-Mäusen im bronchialen Abschnitt nach Stimulation mit 1 mM und 10 mM ist auch hier eine sinkende Tendenz bei steigender Cycloheximid Konzentration zu erkennen. Beim Vergleich der beiden Mausstämme kann im trachealen Abschnitt nach Stimulation mit 100 µM und im bronchialen Abschnitt nach Stimulation mit 1 mM Cycloheximid ein signifikant geringeres Ausmaß der Migration bei CC1^{-/-}-Mäusen festgestellt werden. Das Fehlen des Rezeptors scheint das Trachealepithel unempfindlicher gegenüber Cycloheximid zu machen. Dies zeigt sich durch eine verminderte Plasmaextravasation sowie eine verminderte Migration neutrophiler Granulozyten bei CC1^{-/-}-Mäusen. Nouvion und Mitarbeiter konnten bei CC1^{-/-}-Mäusen eine fehlende Erhöhung der Plasmaextravasation nach akuter Reizung der Haut zeigen. Während die basale Gefäßpermeabilität bei CC1^{-/-}-Mäusen erhöht war, zeigte sich, nach Applikation von Senföl auf die Ohren, bei CC1^{-/-}-Mäusen eine deutlich verminderte akute Erhöhung der Plasmaextravasation in der Haut verglichen mit den WT-Kontrollen (Nouvion et al., 2010). Diese schwächere Reaktion der Haut von CC1^{-/-}-Mäusen auf die akute Reizung durch Senföl bestätigt unsere Beobachtung einer schwächeren Reaktion der CC1^{-/-}-Mäuse nach Exposition des Atemwegsepithels gegenüber dem Bitterstoff Cycloheximid. Bisherigen Erkenntnissen zufolge kommt es in der Nase nach Stimulation mit Denatonium, der bittersten bekannten Substanz, und dem bakteriellen Signalmolekül 3-Oxo-C12-Homoserinlacton durch Aktivierung der Geschmackskaskade zu einer ACh-Freisetzung, die zur Ausschüttung von Neuropeptiden führt (Saunders et al., 2014). ACh bindet an den ACh-Rezeptor der Nervenfasern und führt so zur Freisetzung von Neuropeptiden. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass sensorische Neurone, die zur Lunge projizieren, den alpha3-ACh-Rezeptor aufweisen (Krasteva et al., 2011). Die signifikante Erhöhung der Plasmaextravasation nach Cycloheximid-Stimulation bei WT- und CC1^{-/-}-Mäusen stellt somit wahrscheinlich eine Reaktion auf die

Aktivierung der Geschmackskaskade dar. Es ist denkbar, dass bei hohen Cycloheximid-Konzentrationen zusätzlich zum Tas2R105 Rezeptor die TRP-Kanäle aktiviert werden. TRPA1- und TRPV1-Kanäle kommen auf Nervenendigungen der sensiblen Fasern im Trachealepithel von Mäusen vor (Kichko & Reeh, 2009; Kichko et al., 2015). Bei CC1^{-/-}-Mäusen konnte in der vorgelegten Arbeit erst bei einer Cycloheximidkonzentration von 10 mM eine signifikante Erhöhung der Plasmaextravasation festgestellt werden, was darauf hindeutet, dass erst die Aktivierung der TRPA1 / TRPV1-Kanäle eine signifikante Erhöhung der Plasmaextravasation verursacht. TRPA1 / TRPV1-Kanäle sind an Schmerz und Temperaturwahrnehmung beteiligt und haben bei Aktivierung eine proinflammatorische Wirkung, was sie zu einer Art Sensor bei akuter Gefahr macht (Gouin et al., 2017). Dass Reeh und Kichko bei der Gabe von 10 mM Cycloheximid eine Aktivierung der Kanäle zeigten (unveröffentlichte Arbeit), könnte darauf hindeuten, dass diese Konzentration für den in dieser Arbeit beschriebenen *in vivo* Versuch bereits zu hoch ist. Das Öffnen der TRPA1 / TRPV1-Kanäle spricht für eine überschießende Immunreaktion und keine rein protektive Immunantwort. Bakterielle Lipopolysaccharide (LPS), die beim Zerfall von Bakterien entstehen, können TRPA1-Kanäle direkt aktivieren (Meseguer et al., 2014). Es ist denkbar, dass Cycloheximid, ähnlich wie LPS, direkt auf diese Kanäle wirkt und so eine Ausschüttung von CGRP auslöst. Interessanterweise zeigte sich in den Untersuchungen der Arbeitsgruppe Ghavampour und Kollegen, dass bei neun Monate alten WT-Mäusen die aortale Permeabilität gewaltig ansteigt, jedoch in gleichaltrigen CC1^{-/-}-Mäusen sinkt. Somit scheint CEACAM1 die Funktion der endothelialen Barriere auch altersabhängig zu beeinflussen (Ghavampour et al., 2018). Für die altersabhängige Abnahme der endothelialen Permeabilität in Aorten neun Monate alter CC1^{-/-}-Mäuse, nannte die Arbeitsgruppe Ghavampour et al. die Konzentration des Tumor Nekrose Faktors Alpha (TNF α) als mögliche Ursache (Ghavampour et al., 2018). Die Konzentration des TNF α war bei neunmonatigen WT-Mäusen im Vergleich zu gleichaltrigen CC1^{-/-}-Mäusen stark erhöht. Die Anwesenheit von CEACAM1 scheint also die Bildung des TNF α in alten CC1^{-/-}-Mäusen zu beeinflussen. Auch die Neuropeptide CGRP und SP können zu einer Freisetzung von TNF α führen

(Cuesta, Quintero, Pons, & Suarez-Roca, 2002). Es ist also denkbar, dass auch bei dreimonatigen Mäusen im Falle einer neurogenen Entzündungsreaktion die Bildung des $\text{TNF}\alpha$ durch CEACAM1-Defizienz geringer ausfallen könnte. Auch wenn dieser Ansatz die basal verminderte endotheliale Permeabilität in bronchialen postkapillären Venolen von $\text{CC1}^{-/-}$ -Mäusen nicht erklären kann, könnte die Beeinflussung von $\text{TNF}\alpha$ durch CEACAM1 das veränderte Entzündungsgeschehen mit verminderter Plasmaextravasation und Leukozytenmigration bei $\text{CC1}^{-/-}$ -Mäusen in diesem Gefäßabschnitt erklären.

Der CEACAM1-Rezeptor fungiert im menschlichen Bronchialepithel u.a. als Pathogenrezeptor für verschiedene Bakterienstämme (Slevogt et al., 2008; Voges et al., 2010). Bei Mäusen ist die Infektion mit dem Hepatitis Virus MHV-A59 abhängig von dem Vorhandensein des CEACAM1-Moleküls (Hemmila et al., 2004). Es gibt also Hinweise auf einen Zusammenhang der CEACAM1-Expression mit der Entstehung von bakteriellen und viralen Erkrankungen. Die Stimulation erfolgt in diesem Versuch jedoch nicht mit einem Pathogen, sondern nur mit einer Substanz, die das Vorhandensein eines Pathogenes simuliert. Dadurch wollten wir die Interaktion von Pathogenen mit dem CEACAM1-Rezeptor ausschließen. Der Versuch untersucht nicht die Funktion von CEACAM1 als Pathogenrezeptor, sondern seine Rolle bei der Entstehung einer neurogenen Entzündungsreaktion. Die Arbeitsgruppe Ghavampour et al. konnte bei $\text{CC1}^{-/-}$ -Mäusen eine gesteigerte Interaktion von Leukozyten mit dem Endothel der Aorta beobachten. Begründet wurde dies mit einer Veränderung der Glykokalyx (Ghavampour et al., 2018). Apikal besitzen Endothelzellen einen Besatz aus Polysacchariden und Proteoglykanen, der in seiner Gesamtheit als Glykokalyx bezeichnet wird. Die Glykokalyx fungiert als Mechanosensor für Scherkräfte und erschwert die Interaktion von Leukozyten mit dem Endothel. Pathologische Stimuli fördern den Abbau der Glykokalyx und gehen so mit einer vermehrten Interaktion der Leukozyten mit dem Endothel einher (Alphonsus & Rodseth, 2014). Ghavampour et al. konnten zeigen, dass $\text{CC1}^{-/-}$ -Mäuse eine verminderte aortale Glykokalyx aufweisen, was mit einer erhöhten Expression der Matrix-Metalloproteasen-9 (MMP-9) durch neutrophile Granulozyten in $\text{CC1}^{-/-}$ -Mäusen erklärt wurde (Ghavampour et al., 2018). MMP-9 spielt eine Rolle bei der

Glykokalixreduzierung (Ramnath et al., 2014). MMP-9 und andere glykokalixabbauende Enzyme werden in CC1^{-/-}-Mäusen vermehrt exprimiert, womit CEACAM1 eine protektive Rolle hinsichtlich der endothelialen Glykokalix einzunehmen scheint (Ghavampour et al., 2018). Die Glykokalix variiert bezüglich ihrer Dicke und Verteilung je nach Gefäßabschnitt. In der Aorta von Mäusen und Ratten konnte ein gleichmäßiges Verteilungsmuster der Glykokalix beobachtet werden, während in kleinen Gefäßen das Verteilungsmuster ungleichmäßiger ist. Die Dicke der Glykokalix beträgt bei Mäusen in der Aorta $2,1 \pm 0,2$ in Kapillaren und postkapillären Venolen nur $0,9 \pm 0,1$ μm bzw. $1,2 \pm 0,3$ μm . In Arteriolen konnte keine Glykokalix nachgewiesen werden (Yen, Cai, Zeng, Tarbell, & Fu, 2012). Die starke Variation der Dicke und des Verteilungsmusters der Glykokalix in den unterschiedlichen Gefäßabschnitten nimmt Einfluss auf Permeabilität und Zelladhäsion. Die regelmäßige Verteilung in der Aorta lässt auf eine gleichmäßige, niedrigere Permeabilität schließen, während die durchbrochene und dünnere Glykokalix der Kapillaren und postkapillären Venolen eine erhöhte Permeabilität und vermehrte Zelladhäsion begünstigt (Yen et al., 2012). Die starke Varianz im Aufbau der Glykokalix spiegelt ihre individuelle Anpassung an die Anforderungen in den unterschiedlichen Gefäßabschnitten wider. Die Ergebnisse der Arbeitsgruppe Ghavampour et al. zeigen, dass CEACAM1-Defizienz die Interaktion von Leukozyten mit dem Endothel erhöht und die endotheliale Barrierefunktion schwächt (Ghavampour et al., 2018). Die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit zeigen neben der verminderten Plasmaextravasation eine verminderte Migration neutrophiler Granulozyten bei CEACAM1-Defizienz. Es ist auffällig, dass sich die Veränderung dieser beiden Entzündungsparameter entgegen der in der Literatur beschriebenen Erkenntnisse darstellt. Die verstärkte endotheliale Barrierefunktion bei CEACAM1-Defizienz lässt am ehesten eine spezielle Funktion des Moleküls in trachealen postkapillären Venolen vermuten. Zudem wird im Versuchsmodell dieser Arbeit die Auswirkung einer akuten Entzündungsreaktion auf die Plasmaextravasation und Entzündungszellmigration untersucht. Eine chronische Entzündungsreaktion wie die Plaqueentstehung in der Aorta ist somit nicht uneingeschränkt vergleichbar. Dass extraepithelial deutlich mehr

neutrophile Granulozyten nachweisbar sind, ist mit der Lokalisation der Blutgefäße erklärbar. Da das Epithel selbst gefäßfrei ist, gelangen die Entzündungszellen beim Austritt aus den Gefäßen vor allem in das angrenzende Bindegewebe, die Lamina propria. Die Ausschüttung von CGRP führt zu einer Vasodilatation in benachbarten Gefäßen. Es wird angenommen, dass CGRP zusammen mit dem Neurotransmitter Substanz P ausgeschüttet wird, da Nervenfasern, die nasale Bürstenzellen kontaktieren, sowohl für CGRP als auch für SP positiv sind (Tizzano et al., 2010; Saunders et al., 2014).

Die vorliegende Arbeit konnte eine Ausschüttung von CGRP als Reaktion auf Cycloheximid-Stimulation zeigen. Eine Ausschüttung von SP durch Cycloheximid-Stimulation müsste jedoch noch bestätigt werden. Die Freisetzung von SP würde zusätzlich zu einer verstärkten Plasmaextravasation führen. In der Haut, den Spinalganglien und dem Rückenmark von Mäusen konnte gezeigt werden, dass auch CGRP-positive (CGRP⁺) primär afferente Neurone vorkommen, die SP-negativ (SP⁻) sind. In der Haut der Vorderpfoten von Mäusen kommen CGRP⁺- und SP⁺- sowie CGRP⁺- und SP⁻-Fasern zusammen in Bündeln in der tiefen Dermis und der dermoepithelialen Junction vor. Beide penetrieren teilweise die Epidermis. Alle SP⁺-Fasern waren auch positiv für CGRP. Die CGRP⁺-Fasern konnten in SP⁺- und SP⁻-Fasern unterteilt werden. Die meisten CGRP⁺-Fasern nahe der dermoepithelialen Grenze enthielten gleichzeitig auch SP. Häufig fehlte den feineren CGRP⁺-Fasern SP, vor allem denen, die nah an Kapillaren gelegen waren (Kestell et al., 2015). Basierend auf diesen Erkenntnissen kann auch in den Atemwegen nicht generell von einer gemeinsamen Freisetzung von CGRP und SP ausgegangen werden. Käme es nur zu einer CGRP-Ausschüttung, wäre auch nur mit einer Vasodilatation zu rechnen und mit keinem starken Anstieg der Extravasation. Das in den Ergebnissen gezeigte niedrige Ausmaß der Plasmaextravasation könnte dafür sprechen, dass Cycloheximid nur zu einer CGRP-Freisetzung führt. Dennoch zeigt die vermehrte Migration von Immunzellen, dass Cycloheximid in der Lage ist, lokal die endotheliale Permeabilität zu beeinflussen.

Ein weiterer nicht zu vernachlässigender Mediator im lokalen Entzündungsgeschehen ist Histamin, das von Mastzellen freigesetzt wird. Es

wurde bisher nicht untersucht, ob auch Mastzellen durch Cycloheximid aktiviert werden. In der Nase konnte gezeigt werden, dass die Freisetzung von ACh und Neuropeptiden Mastzellen aktiviert (Saunders et al., 2014). Die Dichte der Mastzellen in Mukosa und Parenchym nimmt von der Nase hin zu den intrapulmonalen Atemwegen kontinuierlich zu (de Magalhaes Simoes et al., 2005). Dies spricht für eine Beeinflussung der Entzündungsreaktion in Trachea und Bronchien durch Mastzelldegranulation, mit einer Zunahme der Reaktion zu den tieferen Atemwegen hin. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten basal und nach Stimulation mit Cycloheximid, eine verminderte Plasmaextravasation im bronchialen Abschnitt verglichen mit dem trachealen Abschnitt, womit eine Beeinflussung der Entzündungsreaktion durch Mastzelldegranulation nicht bestätigt werden konnte.

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass inhalativ verabreichtes Cycloheximid eine Entzündungsreaktion im Gewebe des mittleren und unteren Atemwegsanschnitts auslösen kann. Das Vorhandensein CGRP-positiver Fasern in unmittelbarer Nähe von Bürstenzellen des Trachealepithels (Krasteva et al., 2011) deutet darauf hin, dass über die Aktivierung der Geschmackskaskade eine ACh-Freisetzung aus trachealen Bürstenzellen mit anschließender Ausschüttung von Neuropeptiden aus sensorischen Nervenendigungen denkbar ist. Der häufige Kontakt von Bürstenzellen zu CGRP-positiven Fasern ist jedoch eventuell nicht nötig, da die Ausschüttung von ACh auch über einen parakrinen Mechanismus die Freisetzung von Neuropeptiden aus den Varikositäten von C-Fasern auslösen könnte (Krasteva et al., 2011). Um freie Nervenendigungen zu erreichen, müssen Stimulanzien durch die epitheliale Barriere diffundieren. Viele chemische Stimuli sind fettlöslich und können daher die epitheliale Barriere einfach überwinden und zu den sensorischen Nervenendigungen diffundieren. So könnten lipophile Stoffe zu einer direkten Aktivierung von sensorischen Fasern führen. Laut Herstellerangaben ist Cycloheximid in Wasser löslich und somit eher lipophob (Sigma-Aldrich GmbH, Produktinformationen zu Art. C7698, 2006). Im Fall von lipophoben Stoffen könnten Bürstenzellen als spezialisierte, chemosensorische Zellen ein System zur Wahrnehmung darstellen (Finger et al., 2003). Die Literatur

gibt deutliche Hinweise auf eine wichtige Rolle chemosensorischer Zellen der Mukosa bei der Initiierung protektiver Schutzreflexe. Bitter schmeckende bakterielle Signalmoleküle können einen Hinweis auf bakterielle Kolonisierung darstellen. Das Signalmolekül 3-Oxo-C12-Homoserinlacton, das von *Pseudomonas aeruginosa* produziert wird, führt nach Applikation auf das Atemwegsepithel von Mäusen zu einem Abfall der Atemfrequenz und einer Erhöhung der Geschwindigkeit des Partikeltransports auf der Schleimhautoberfläche (Krasteva et al., 2012b). Als protektiver Schutzreflex nach intranasaler Reizung mit Cycloheximid ist, neben der Freisetzung von Neuropeptiden (Reeh und Kichko, unveröffentlichte Arbeit), noch die Aktivierung trigeminaler Fasern mit einer anschließenden Veränderung der Atemfrequenz beschrieben (Chandrashekar et al., 2000; Finger et al., 2003; Krasteva et al., 2011). Auch kann ein rascher Abfall der Atemfrequenz als Reaktion auf intratracheale Gabe des Bitterstoffs Cycloheximid beobachtet werden (Krasteva et al., 2011). Deshpande und Kollegen konnten zeigen, dass Tas2-Rezeptoren auf Muskelzellen der Atemwege exprimiert werden, die nach Stimulation mit Bittersubstanzen einen intrazellulären Calciumanstieg mit einer Muskelrelaxation zeigen (Deshpande et al., 2010). Diese Ergebnisse wurden jedoch in Frage gestellt (Belvisi, Dale, Birrell, & Canning, 2011; Morice et al., 2011). Laut den Arbeiten von Gulbransen und Tizzano reagieren isolierte chemosensorische Zellen der Nase auf Denatonium, Adenosintri-phosphat (ATP), Acetylcholin und bakterielle Bitterkomponenten mit einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (Gulbransen, Clapp, Finger, & Kinnamon, 2008; Tizzano et al., 2010). Sowohl Denatonium als auch Cycloheximid sind in der Lage, Tas-Rezeptoren zu aktivieren. Unterschiede in der ausgelösten Reaktion könnten dadurch erklärt werden, dass die Substanzen als Agonisten an zwei unterschiedlichen Tas2-Rezeptoren wirken. Cycloheximid konnte als ein Bitterstoff mit besonders hoher Potenz hinsichtlich der Tas2R105-Aktivierung identifiziert werden (Chandrashekar et al., 2000; Lossow et al., 2016). Da schon eine Konzentration von 10 nM Cycloheximid in der Lage war, eine Aktivierung des Rezeptors zu bewirken, stellt sich die Frage, ob die in diesem Versuch verwendeten Konzentrationen schon zu hoch gewählt sind. Des Weiteren kommt

der Rezeptor eventuell zu selten vor, wodurch Cycloheximid, durch seine spezifische Aktivierung nur diese Rezeptors, eine eher schwache Antwort auslösen könnte.

5 Zusammenfassung

Im Zuge dieser Dissertationsarbeit konnte ein *in vivo* Versuchsmodell zur Quantifizierung neurogener Entzündungsreaktionen in den Atemwegen etabliert werden. Die Versuche zeigen bei CC1^{-/-}-Mäusen eine Verminderung der basalen Permeabilität in trachealen postkapillären Venolen. Nach Stimulation mit dem bakteriellen Bitterstoff Cycloheximid zeigen CC1^{-/-}-Mäuse im Vergleich mit WT-Mäusen eine verminderte Plasmaextravasation in bronchialen postkapillären Venolen. Auch die Permeabilität des Endothels für neutrophile Granulozyten scheint durch CEACAM1-Defizienz in trachealen und bronchialen Venolen herabgesetzt zu werden. Die Anwesenheit des CEACAM1-Moleküls verursacht offenbar eine verminderte Stabilität der endothelialen Barriere in postkapillären Venolen der Atemwege. Diese Ergebnisse zeigen eine gegenteilige Funktion von CEACAM1 in postkapillären Venolen der Atemwege im Vergleich mit großen, herznahen Blutgefäßen. Des Weiteren scheint sich die Rolle von CEACAM1 in der Entstehung von akuten und chronischen Entzündungsreaktionen zu unterscheiden. Cycloheximid ist in der Lage, eine Erhöhung der Plasmaextravasation und Migration neutrophiler Granulozyten zu bewirken. Somit kann Cycloheximid nicht nur protektive Schutzreflexe auslösen, sondern führt auch lokal zu einer neurogenen Entzündungsreaktion. Die Vermutung, dass Bürstenzellen „schmecken“ können, ist bislang eher spekulativ. Das in dieser Arbeit etablierte Versuchsmodell stellt eine Möglichkeit dar, diese Fähigkeit für verschiedene Stimulanzen zu testen und zu quantifizieren. Es stehen Mäuse zur Verfügung, die keine Bürstenzellen aufweisen oder Komponenten der Geschmackskaskade nicht exprimieren. Für weitere Erkenntnisse zur Rolle der Bürstenzelle in der Entstehung von neurogener Entzündung, könnten Versuche mit diesen Mäusen in Zukunft interessant sein.

6 Literaturverzeichnis

- Alphonsus, C. S., & Rodseth, R. N. (2014). The endothelial glycocalyx: a review of the vascular barrier. *Anaesthesia*, *69*(7), 777-784. doi:10.1111/anae.12661
- Amulic, B., Cazalet, C., Hayes, G. L., Metzler, K. D., & Zychlinsky, A. (2012). Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu Rev Immunol*, *30*, 459-489. doi:10.1146/annurev-immunol-020711-074942
- Aplin, A. E., Howe, A., Alahari, S. K., & Juliano, R. L. (1998). Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol Rev*, *50*(2), 197-263.
- Baluk, P. (1997). Neurogenic inflammation in skin and airways. *J Investig Dermatol Symp Proc*, *2*(1), 76-81.
- Barnett, T. R., Drake, L., & Pickle, W., 2nd. (1993). Human biliary glycoprotein gene: characterization of a family of novel alternatively spliced RNAs and their expressed proteins. *Mol Cell Biol*, *13*(2), 1273-1282.
- Bayliss, W. M. (1901). On the origin from the spinal cord of the vaso-dilator fibres of the hind-limb, and on the nature of these fibres. *J Physiol*, *26*(3-4), 173-209.
- Beauchemin, N., Draber, P., Dveksler, G., Gold, P., Gray-Owen, S., Grunert, F., . . . Zimmermann, W. (1999). Redefined nomenclature for members of the carcinoembryonic antigen family. *Exp Cell Res*, *252*(2), 243-249.
- Belvisi, M. G., Dale, N., Birrell, M. A., & Canning, B. J. (2011). Bronchodilator activity of bitter tastants in human tissue. *Nat Med*, *17*(7), 776. doi:10.1038/nm0711-776a
- Borregaard, N. (2010). Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity*, *33*(5), 657-670. doi:10.1016/j.immuni.2010.11.011
- Brain, S. D., Tippins, J. R., Morris, H. R., MacIntyre, I., & Williams, T. J. (1986). Potent vasodilator activity of calcitonin gene-related peptide in human skin. *J Invest Dermatol*, *87*(4), 533-536.
- Brown, M. A., Mitar, D. A., & Whitworth, J. A. (1992). Measurement of plasma volume in pregnancy. *Clin Sci (Lond)*, *83*(1), 29-34.
- Bruce, A. N. (1910). Über die Beziehung der sensiblen Nervenendigungen zum Entzündungsvorgang. *Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie*, *63*(5-6), 424-433.
- Bruce, A. N. (1913). Vaso-dilator axon-reflexes. *Experimental Physiology*, *6*, 339-354.
- Canning, B. J., Chang, A. B., Bolser, D. C., Smith, J. A., Mazzone, S. B., McGarvey, L., & Panel, C. E. C. (2014). Anatomy and neurophysiology of cough: CHEST Guideline and Expert Panel report. *Chest*, *146*(6), 1633-1648. doi:10.1378/chest.14-1481
- Chandrashekar, J., Mueller, K. L., Hoon, M. A., Adler, E., Feng, L., Guo, W., . . . Ryba, N. J. (2000). T2Rs function as bitter taste receptors. *Cell*, *100*(6), 703-711.
- Clasen, R. A., Pandolfi, S., & Hass, G. M. (1970). Vital staining, serum albumin and the blood-brain barrier. *J Neuropathol Exp Neurol*, *29*(2), 266-284.

- Coleridge, H. M., & Coleridge, J. C. (1994). Pulmonary reflexes: neural mechanisms of pulmonary defense. *Annu Rev Physiol*, *56*, 69-91. doi:10.1146/annurev.ph.56.030194.000441
- Coleridge, H. M. C., & J. C. G. (1986). *Reflexes evoked from tracheobronchial tree and lungs* (Vol. 2): American Physiology Society, Bethesda.
- Coleridge, J. C., & Coleridge, H. M. (1984). Afferent vagal C fibre innervation of the lungs and airways and its functional significance. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, *99*, 1-110.
- Crockett-Torabi, E., & Ward, P. A. (1996). The role of leukocytes in tissue injury. *Eur J Anaesthesiol*, *13*(3), 235-246.
- Cuesta, M. C., Quintero, L., Pons, H., & Suarez-Roca, H. (2002). Substance P and calcitonin gene-related peptide increase IL-1 beta, IL-6 and TNF alpha secretion from human peripheral blood mononuclear cells. *Neurochem Int*, *40*(4), 301-306.
- Davies, A., & Moores, C. (2010). *Systems of the Body, The Respiratory System, Basic science and clinical conditions* (2 ed.): Elsevier.
- de Magalhaes Simoes, S., dos Santos, M. A., da Silva Oliveira, M., Fontes, E. S., Fernezlian, S., Garippo, A. L., . . . Dolhnikoff, M. (2005). Inflammatory cell mapping of the respiratory tract in fatal asthma. *Clin Exp Allergy*, *35*(5), 602-611. doi:10.1111/j.1365-2222.2005.02235.x
- Deckmann, K., Filipinski, K., Krasteva-Christ, G., Fronius, M., Althaus, M., Rafiq, A., . . . Kummer, W. (2014). Bitter triggers acetylcholine release from polymodal urethral chemosensory cells and bladder reflexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *111*(22), 8287-8292. doi:10.1073/pnas.1402436111
- Deshpande, D. A., Wang, W. C., McIlmoyle, E. L., Robinett, K. S., Schillinger, R. M., An, S. S., . . . Liggett, S. B. (2010). Bitter taste receptors on airway smooth muscle bronchodilate by localized calcium signaling and reverse obstruction. *Nat Med*, *16*(11), 1299-1304. doi:10.1038/nm.2237
- Dveksler, G. S., Dieffenbach, C. W., Cardellicchio, C. B., McCuaig, K., Pensiero, M. N., Jiang, G. S., . . . Holmes, K. V. (1993). Several members of the mouse carcinoembryonic antigen-related glycoprotein family are functional receptors for the coronavirus mouse hepatitis virus-A59. *J Virol*, *67*(1), 1-8.
- Egawa, G., Nakamizo, S., Natsuaki, Y., Doi, H., Miyachi, Y., & Kabashima, K. (2013). Intravital analysis of vascular permeability in mice using two-photon microscopy. *Sci Rep*, *3*, 1932. doi:10.1038/srep01932
- Ehrlich, P. (1880). Methodologische Beiträge zur Physiologie und Pathologie der verschiedenen Formen der Leukocyten. *Zeitschrift für klinische Medizin*, *1*, 553-560.
- Ergun, S., Kilik, N., Ziegeler, G., Hansen, A., Nollau, P., Gotze, J., . . . Wagener, C. (2000). CEA-related cell adhesion molecule 1: a potent angiogenic factor and a major effector of vascular endothelial growth factor. *Mol Cell*, *5*(2), 311-320.
- Erjefalt, J. S., Sundler, F., & Persson, C. G. (1997). Epithelial barrier formation by airway basal cells. *Thorax*, *52*(3), 213-217.
- Fillenz, M., & Widdicombe, J. G. (1972). Receptors of the Lungs and Airways. *Handbook of Sensory Physiology*, *3 / 1*, 81-112.

- Finger, T. E., Bottger, B., Hansen, A., Anderson, K. T., Alimohammadi, H., & Silver, W. L. (2003). Solitary chemoreceptor cells in the nasal cavity serve as sentinels of respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *100*(15), 8981-8986. doi:10.1073/pnas.1531172100
- Finger, T. E., & Kinnamon, S. C. (2011). Taste isn't just for taste buds anymore. *F1000 Biol Rep*, *3*, 20. doi:10.3410/B3-20
- Forssmann, W. G., Ito, S., Weihe, E., Aoki, A., Dym, M., & Fawcett, D. W. (1977). An improved perfusion fixation method for the testis. *Anat Rec*, *188*(3), 307-314. doi:10.1002/ar.1091880304
- Gage, G. J., Kipke, D. R., & Shain, W. (2012). Whole animal perfusion fixation for rodents. *J Vis Exp*(65). doi:10.3791/3564
- Gavard, J., & Gutkind, J. S. (2008). VE-cadherin and claudin-5: it takes two to tango. *Nat Cell Biol*, *10*(8), 883-885. doi:10.1038/ncb0808-883
- Ghavampour, S., Kleefeldt, F., Bommel, H., Volland, J., Paus, A., Horst, A., . . . Ergun, S. (2018). Endothelial barrier function is differentially regulated by CEACAM1-mediated signaling. *FASEB J*, fj201800331R. doi:10.1096/fj.201800331R
- Giannotta, M., Trani, M., & Dejana, E. (2013). VE-cadherin and endothelial adherens junctions: active guardians of vascular integrity. *Dev Cell*, *26*(5), 441-454. doi:10.1016/j.devcel.2013.08.020
- Godfraind, C., Langreth, S. G., Cardellicchio, C. B., Knobler, R., Coutelier, J. P., Dubois-Dalcq, M., & Holmes, K. V. (1995). Tissue and cellular distribution of an adhesion molecule in the carcinoembryonic antigen family that serves as a receptor for mouse hepatitis virus. *Lab Invest*, *73*(5), 615-627.
- Gold, P., & Freedman, S. O. (1965). Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J Exp Med*, *122*(3), 467-481.
- Gouin, O., L'Herondelle, K., Lebonvallet, N., Le Gall-Ianotto, C., Sakka, M., Buhe, V., . . . Le Garrec, R. (2017). TRPV1 and TRPA1 in cutaneous neurogenic and chronic inflammation: pro-inflammatory response induced by their activation and their sensitization. *Protein Cell*, *8*(9), 644-661. doi:10.1007/s13238-017-0395-5
- Gray-Owen, S. D., & Blumberg, R. S. (2006). CEACAM1: contact-dependent control of immunity. *Nat Rev Immunol*, *6*(6), 433-446. doi:10.1038/nri1864
- Gulbransen, B. D., Clapp, T. R., Finger, T. E., & Kinnamon, S. C. (2008). Nasal solitary chemoreceptor cell responses to bitter and trigeminal stimulants in vitro. *J Neurophysiol*, *99*(6), 2929-2937. doi:10.1152/jn.00066.2008
- Hemmila, E., Turbide, C., Olson, M., Jothy, S., Holmes, K. V., & Beauchemin, N. (2004). Ceacam1a^{-/-} mice are completely resistant to infection by murine coronavirus mouse hepatitis virus A59. *J Virol*, *78*(18), 10156-10165. doi:10.1128/JVI.78.18.10156-10165.2004
- Herbert, M. K., & Holzer, P. (2002). [Neurogenic inflammation. I. Basic mechanisms, physiology and pharmacology]. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*, *37*(6), 314-325. doi:10.1055/s-2002-32233
- Hofer, D., & Drenckhahn, D. (1992). Identification of brush cells in the alimentary and respiratory system by antibodies to villin and fimbrin. *Histochemistry*, *98*(4), 237-242.

- Hofer, D., & Drenckhahn, D. (1998). Identification of the taste cell G-protein, alpha-gustducin, in brush cells of the rat pancreatic duct system. *Histochem Cell Biol*, *110*(3), 303-309.
- Holzer, P. (1992). Peptidergic sensory neurons in the control of vascular functions: mechanisms and significance in the cutaneous and splanchnic vascular beds. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, *121*, 49-146.
- Hoon, M. A., Adler, E., Lindemeier, J., Battey, J. F., Ryba, N. J., & Zuker, C. S. (1999). Putative mammalian taste receptors: a class of taste-specific GPCRs with distinct topographic selectivity. *Cell*, *96*(4), 541-551.
- Horst, A. K., Ito, W. D., Dabelstein, J., Schumacher, U., Sander, H., Turbide, C., . . . Wagener, C. (2006). Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 modulates vascular remodeling in vitro and in vivo. *J Clin Invest*, *116*(6), 1596-1605. doi:10.1172/JCI24340
- Hunter, D. D., & Udem, B. J. (1999). Identification and substance P content of vagal afferent neurons innervating the epithelium of the guinea pig trachea. *Am J Respir Crit Care Med*, *159*(6), 1943-1948. doi:10.1164/ajrccm.159.6.9808078
- Iyengar, S., Ossipov, M. H., & Johnson, K. W. (2017). The role of calcitonin gene-related peptide in peripheral and central pain mechanisms including migraine. *Pain*, *158*(4), 543-559. doi:10.1097/j.pain.0000000000000831
- Jancsó, N. (1960). Role of the nerve terminals in the mechanism of inflammatory reactions. *Bull Millard Fillmore Hosp., Buffalo, NY*, 53-77.
- Jancsó, N., Jancsó-Gabor, A., & Szolcsanyi, J. (1967). Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin. *Br J Pharmacol Chemother*, *31*(1), 138-151.
- Jancsó, N., Jancsó-Gabor, A., & Szolcsanyi, J. (1968). The role of sensory nerve endings in neurogenic inflammation induced in human skin and in the eye and paw of the rat. *Br J Pharmacol Chemother*, *33*(1), 32-41.
- Joris, I., Majno, G., Corey, E. J., & Lewis, R. A. (1987). The mechanism of vascular leakage induced by leukotriene E4. Endothelial contraction. *Am J Pathol*, *126*(1), 19-24.
- Karlsson, J. A., Sant'Ambrogio, G., & Widdicombe, J. (1988). Afferent neural pathways in cough and reflex bronchoconstriction. *J Appl Physiol* (1985), *65*(3), 1007-1023. doi:10.1152/jappl.1988.65.3.1007
- Kaske, S., Krasteva, G., Konig, P., Kummer, W., Hofmann, T., Gudermann, T., & Chubanov, V. (2007). TRPM5, a taste-signaling transient receptor potential ion-channel, is a ubiquitous signaling component in chemosensory cells. *BMC Neurosci*, *8*, 49. doi:10.1186/1471-2202-8-49
- Kenins, P., Hurley, J. V., & Bell, C. (1984). The role of substance P in the axon reflex in the rat. *Br J Dermatol*, *111*(5), 551-559.
- Kestell, G. R., Anderson, R. L., Clarke, J. N., Haberberger, R. V., & Gibbins, I. L. (2015). Primary afferent neurons containing calcitonin gene-related peptide but not substance P in forepaw skin, dorsal root ganglia, and spinal cord of mice. *J Comp Neurol*, *523*(17), 2555-2569. doi:10.1002/cne.23804
- Kichko, T. I., Kobal, G., & Reeh, P. W. (2015). Cigarette smoke has sensory effects through nicotinic and TRPA1 but not TRPV1 receptors on the isolated mouse

- trachea and larynx. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 309(8), L812-820. doi:10.1152/ajplung.00164.2015
- Kichko, T. I., Lennerz, J., Eberhardt, M., Babes, R. M., Neuhuber, W., Kobal, G., & Reeh, P. W. (2013). Bimodal concentration-response of nicotine involves the nicotinic acetylcholine receptor, transient receptor potential vanilloid type 1, and transient receptor potential ankyrin 1 channels in mouse trachea and sensory neurons. *J Pharmacol Exp Ther*, 347(2), 529-539. doi:10.1124/jpet.113.205971
- Kichko, T. I., & Reeh, P. W. (2009). TRPV1 controls acid- and heat-induced calcitonin gene-related peptide release and sensitization by bradykinin in the isolated mouse trachea. *Eur J Neurosci*, 29(9), 1896-1904. doi:10.1111/j.1460-9568.2009.06747.x
- Kilic, N., Oliveira-Ferrer, L., Neshat-Vahid, S., Irmak, S., Obst-Pernberg, K., Wurmbach, J. H., . . . Ergun, S. (2007). Lymphatic reprogramming of microvascular endothelial cells by CEA-related cell adhesion molecule-1 via interaction with VEGFR-3 and Prox1. *Blood*, 110(13), 4223-4233. doi:10.1182/blood-2007-06-097592
- Kilic, N., Oliveira-Ferrer, L., Wurmbach, J. H., Loges, S., Chalajour, F., Neshat-Vahid, S., . . . Ergun, S. (2005). Pro-angiogenic signaling by the endothelial presence of CEACAM1. *J Biol Chem*, 280(3), 2361-2369. doi:10.1074/jbc.M409407200
- Kinnamon, S. C. (2012). Taste receptor signalling - from tongues to lungs. *Acta Physiol (Oxf)*, 204(2), 158-168. doi:10.1111/j.1748-1716.2011.02308.x
- Kong, L. N. (1960). The triple response of Lewis. *Med Bull (Ann Arbor)*, 26, 445-450.
- Krasteva, G., Canning, B. J., Hartmann, P., Veres, T. Z., Papadakis, T., Muhlfeld, C., . . . Kummer, W. (2011). Cholinergic chemosensory cells in the trachea regulate breathing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(23), 9478-9483. doi:10.1073/pnas.1019418108
- Krasteva, G., Canning, B. J., Papadakis, T., & Kummer, W. (2012b). Cholinergic brush cells in the trachea mediate respiratory responses to quorum sensing molecules. *Life Sci*, 91(21-22), 992-996. doi:10.1016/j.lfs.2012.06.014
- Krasteva, G., Hartmann, P., Papadakis, T., Bodenbenner, M., Wessels, L., Weihe, E., . . . Kummer, W. (2012a). Cholinergic chemosensory cells in the auditory tube. *Histochem Cell Biol*, 137(4), 483-497. doi:10.1007/s00418-012-0911-x
- Krasteva, G., & Kummer, W. (2012). "Tasting" the airway lining fluid. *Histochem Cell Biol*, 138(3), 365-383. doi:10.1007/s00418-012-0993-5
- Krasteva-Christ, G., Soultanova, A., Schutz, B., Papadakis, T., Weiss, C., Deckmann, K., . . . Kummer, W. (2015). Identification of cholinergic chemosensory cells in mouse tracheal and laryngeal glandular ducts. *Int Immunopharmacol*, 29(1), 158-165. doi:10.1016/j.intimp.2015.05.028
- Kuespert, K., Pils, S., & Hauck, C. R. (2006). CEACAMs: their role in physiology and pathophysiology. *Curr Opin Cell Biol*, 18(5), 565-571. doi:10.1016/j.ceb.2006.08.008
- Kummer, W., Fischer, A., Kurkowski, R., & Heym, C. (1992). The sensory and sympathetic innervation of guinea-pig lung and trachea as studied by retrograde neuronal tracing and double-labelling immunohistochemistry. *Neuroscience*, 49(3), 715-737.

- Kuroki, M., Arakawa, F., Matsuo, Y., Oikawa, S., Nakazato, H., & Matsuoka, Y. (1991). Three novel molecular forms of biliary glycoprotein deduced from cDNA clones from a human leukocyte library. *Biochem Biophys Res Commun*, *176*(2), 578-585.
- Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., . . . International Human Genome Sequencing, C. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, *409*(6822), 860-921. doi:10.1038/35057062
- Lawrence, M. B., Kansas, G. S., Kunkel, E. J., & Ley, K. (1997). Threshold levels of fluid shear promote leukocyte adhesion through selectins (CD62L,P,E). *J Cell Biol*, *136*(3), 717-727.
- Lee, P. Y., Wang, J. X., Parisini, E., Dascher, C. C., & Nigrovic, P. A. (2013). Ly6 family proteins in neutrophil biology. *J Leukoc Biol*, *94*(4), 585-594. doi:10.1189/jlb.0113014
- Lembrechts, R., Brouns, I., Schnorbusch, K., Pintelon, I., Timmermans, J. P., & Adriaensen, D. (2012). Neuroepithelial bodies as mechanotransducers in the intrapulmonary airway epithelium: involvement of TRPC5. *Am J Respir Cell Mol Biol*, *47*(3), 315-323. doi:10.1165/rcmb.2012-0068OC
- Lembrechts, R., Pintelon, I., Schnorbusch, K., Timmermans, J. P., Adriaensen, D., & Brouns, I. (2011). Expression of mechanogated two-pore domain potassium channels in mouse lungs: special reference to mechanosensory airway receptors. *Histochem Cell Biol*, *136*(4), 371-385. doi:10.1007/s00418-011-0837-8
- Leung, N., Turbide, C., Olson, M., Marcus, V., Jothy, S., & Beauchemin, N. (2006). Deletion of the carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (Ceacam1) gene contributes to colon tumor progression in a murine model of carcinogenesis. *Oncogene*, *25*(40), 5527-5536. doi:10.1038/sj.onc.1209541
- Lewis, T. (1926). The Blood Vessels of the Human Skin. *Br Med J*, *2*(3418), 61-62.
- Libby, P. (2007). Inflammatory mechanisms: the molecular basis of inflammation and disease. *Nutr Rev*, *65*(12 Pt 2), S140-146.
- Lossow, K., Hubner, S., Roudnitzky, N., Slack, J. P., Pollastro, F., Behrens, M., & Meyerhof, W. (2016). Comprehensive Analysis of Mouse Bitter Taste Receptors Reveals Different Molecular Receptive Ranges for Orthologous Receptors in Mice and Humans. *J Biol Chem*, *291*(29), 15358-15377. doi:10.1074/jbc.M116.718544
- Lundberg, J. M., Hokfelt, T., Martling, C. R., Saria, A., & Cuello, C. (1984). Substance P-immunoreactive sensory nerves in the lower respiratory tract of various mammals including man. *Cell Tissue Res*, *235*(2), 251-261.
- Majno, G., Palade, G. E., & Schoefl, G. I. (1961). Studies on inflammation. II. The site of action of histamine and serotonin along the vascular tree: a topographic study. *J Biophys Biochem Cytol*, *11*, 607-626.
- Majno, G., Shea, S. M., & Leventhal, M. (1969). Endothelial contraction induced by histamine-type mediators: an electron microscopic study. *J Cell Biol*, *42*(3), 647-672.

- Makrilia, N., Kollias, A., Manolopoulos, L., & Syrigos, K. (2009). Cell adhesion molecules: role and clinical significance in cancer. *Cancer Invest*, *27*(10), 1023-1037. doi:10.3109/07357900902769749
- Martling, C. R., Saria, A., Fischer, J. A., Hokfelt, T., & Lundberg, J. M. (1988). Calcitonin gene-related peptide and the lung: neuronal coexistence with substance P, release by capsaicin and vasodilatory effect. *Regul Pept*, *20*(2), 125-139.
- Matsuda, R., Nishikawa, A., & Tanaka, H. (1995). Visualization of dystrophic muscle fibers in mdx mouse by vital staining with Evans blue: evidence of apoptosis in dystrophin-deficient muscle. *J Biochem*, *118*(5), 959-964.
- McDonald, D. M. (1994). Endothelial gaps and permeability of venules in rat tracheas exposed to inflammatory stimuli. *Am J Physiol*, *266*(1 Pt 1), L61-83. doi:10.1152/ajplung.1994.266.1.L61
- McDonald, D. M., Thurston, G., & Baluk, P. (1999). Endothelial gaps as sites for plasma leakage in inflammation. *Microcirculation*, *6*(1), 7-22.
- Merigo, F., Benati, D., Tizzano, M., Osculati, F., & Sbarbati, A. (2005). alpha-Gustducin immunoreactivity in the airways. *Cell Tissue Res*, *319*(2), 211-219. doi:10.1007/s00441-004-1007-2
- Meseguer, V., Alpizar, Y. A., Luis, E., Tajada, S., Denlinger, B., Fajardo, O., . . . Viana, F. (2014). TRPA1 channels mediate acute neurogenic inflammation and pain produced by bacterial endotoxins. *Nat Commun*, *5*, 3125. doi:10.1038/ncomms4125
- Meyrick, B., & Reid, L. (1968). The alveolar brush cell in rat lung--a third pneumonocyte. *J Ultrastruct Res*, *23*(1), 71-80.
- Morice, A. H., Bennett, R. T., Chaudhry, M. A., Cowen, M. E., Griffin, S. C., & Loubani, M. (2011). Effect of bitter tastants on human bronchi. *Nat Med*, *17*(7), 775. doi:10.1038/nm0711-775
- Mortimer, C. E., & Müller, U. (2007). *Chemie* (9th ed.): Thieme.
- Najjar, S. M., Ledford, K. J., Abdallah, S. L., Paus, A., Russo, L., Kaw, M. K., . . . Ergun, S. (2013). Ceacam1 deletion causes vascular alterations in large vessels. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, *305*(4), E519-529. doi:10.1152/ajpendo.00266.2013
- Nathan, C. (2006). Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol*, *6*(3), 173-182. doi:10.1038/nri1785
- Nidavani, R. B., Mahalakshmi, A. M., & Shalawadi, M. (2014). Vascular permeability and Evans blue dye: a physiological and pharmacological approach. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, *4*, 106-113. doi:DOI: 10.7324/JAPS.2014.41119
- Nouvion, A. L., Oubaha, M., Leblanc, S., Davis, E. C., Jastrow, H., Kammerer, R., . . . Beauchemin, N. (2010). CEACAM1: a key regulator of vascular permeability. *J Cell Sci*, *123*(Pt 24), 4221-4230. doi:10.1242/jcs.073635
- Obrig, T. G., Culp, W. J., McKeenan, W. L., & Hardesty, B. (1971). The mechanism by which cycloheximide and related glutarimide antibiotics inhibit peptide synthesis on reticulocyte ribosomes. *J Biol Chem*, *246*(1), 174-181.
- Obrink, B. (1997). CEA adhesion molecules: multifunctional proteins with signal-regulatory properties. *Curr Opin Cell Biol*, *9*(5), 616-626.

- Ogura, T., Krosnowski, K., Zhang, L., Bekkerman, M., & Lin, W. (2010). Chemoreception regulates chemical access to mouse vomeronasal organ: role of solitary chemosensory cells. *PLoS One*, *5*(7), e11924. doi:10.1371/journal.pone.0011924
- Oliveira-Ferrer, L., Tilki, D., Ziegeler, G., Hauschild, J., Loges, S., Irmak, S., . . . Ergun, S. (2004). Dual role of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 in angiogenesis and invasion of human urinary bladder cancer. *Cancer Res*, *64*(24), 8932-8938. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-0505
- Oztas, B., Kaya, M., & Camurcu, S. (1992). Influence of profound hypothermia on the blood-brain barrier permeability during acute arterial hypertension. *Pharmacol Res*, *26*(1), 75-84.
- Pack, R. J., Al-Ugaily, L. H., Morris, G., & Widdicombe, J. G. (1980). The distribution and structure of cells in the tracheal epithelium of the mouse. *Cell Tissue Res*, *208*(1), 65-84.
- Panneck, A. R., Rafiq, A., Schutz, B., Soultanova, A., Deckmann, K., Chubanov, V., . . . Kummer, W. (2014). Cholinergic epithelial cell with chemosensory traits in murine thymic medulla. *Cell Tissue Res*, *358*(3), 737-748. doi:10.1007/s00441-014-2002-x
- Pavelka, M., Ronge, H. R., & Stockinger, G. (1976). Vergleichende Untersuchung am Tracheal-epithel verschiedener Säuger. *Acta Anat (Basel)*, *94*(2), 262-282.
- Pavelka, M., & Roth, J. (2005). *Funktionelle Ultrastruktur-Atlas der Biologie und Pathologie von Geweben* (Vol. 1): Springer-Verlag Wien.
- Pernow, B. (1983). Substance P. *Pharmacol Rev*, *35*(2), 85-141.
- Prall, F., Nollau, P., Neumaier, M., Haubeck, H. D., Drzeniek, Z., Helmchen, U., . . . Wagener, C. (1996). CD66a (BGP), an adhesion molecule of the carcinoembryonic antigen family, is expressed in epithelium, endothelium, and myeloid cells in a wide range of normal human tissues. *J Histochem Cytochem*, *44*(1), 35-41.
- Ramnath, R., Foster, R. R., Qiu, Y., Cope, G., Butler, M. J., Salmon, A. H., . . . Satchell, S. C. (2014). Matrix metalloproteinase 9-mediated shedding of syndecan 4 in response to tumor necrosis factor alpha: a contributor to endothelial cell glycocalyx dysfunction. *FASEB J*, *28*(11), 4686-4699. doi:10.1096/fj.14-252221
- Reid, L., Meyrick, B., Antony, V. B., Chang, L. Y., Crapo, J. D., & Reynolds, H. Y. (2005). The mysterious pulmonary brush cell: a cell in search of a function. *Am J Respir Crit Care Med*, *172*(1), 136-139. doi:10.1164/rccm.200502-203WS
- Reppe, W. (1953). Polyvinylpyrrolidon. *Angewandte Chemie*, *65*(23), 577-604. doi:10.1002/ange.19530652302
- Rhodin, J., & Dalhamn, T. (1956). Electron microscopy of the tracheal ciliated mucosa in rat. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*, *44*(4), 345-412.
- Ricco, M. M., Kummer, W., Biglari, B., Myers, A. C., & Udem, B. J. (1996). Interganglionic segregation of distinct vagal afferent fibre phenotypes in guinea-pig airways. *J Physiol*, *496* (Pt 2), 521-530.
- Roberts, W. G., & Palade, G. E. (1995). Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *J Cell Sci*, *108* (Pt 6), 2369-2379.

- Rock, J. R., Randell, S. H., & Hogan, B. L. (2010). Airway basal stem cells: a perspective on their roles in epithelial homeostasis and remodeling. *Dis Model Mech*, 3(9-10), 545-556. doi:10.1242/dmm.006031
- Rosenfeld, M. G., Mermoud, J. J., Amara, S. G., Swanson, L. W., Sawchenko, P. E., Rivier, J., . . . Evans, R. M. (1983). Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissue-specific RNA processing. *Nature*, 304(5922), 129-135.
- Rueckschloss, U., Kuerten, S., & Ergun, S. (2016). The role of CEA-related cell adhesion molecule-1 (CEACAM1) in vascular homeostasis. *Histochem Cell Biol*, 146(6), 657-671. doi:10.1007/s00418-016-1505-9
- Sant'Ambrogio, G. (1987). Nervous receptors of the tracheobronchial tree. *Annu Rev Physiol*, 49, 611-627. doi:10.1146/annurev.ph.49.030187.003143
- Saria, A., & Lundberg, J. M. (1983). Evans blue fluorescence: quantitative and morphological evaluation of vascular permeability in animal tissues. *J Neurosci Methods*, 8(1), 41-49.
- Saunders, C. J., Christensen, M., Finger, T. E., & Tizzano, M. (2014). Cholinergic neurotransmission links solitary chemosensory cells to nasal inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(16), 6075-6080. doi:10.1073/pnas.1402251111
- Saunders, C. J., Reynolds, S. D., & Finger, T. E. (2013). Chemosensory brush cells of the trachea. A stable population in a dynamic epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 49(2), 190-196. doi:10.1165/rcmb.2012-0485OC
- Sauter, S. L., Rutherford, S. M., Wagener, C., Shively, J. E., & Hefta, S. A. (1993). Identification of the specific oligosaccharide sites recognized by type 1 fimbriae from *Escherichia coli* on nonspecific cross-reacting antigen, a CD66 cluster granulocyte glycoprotein. *J Biol Chem*, 268(21), 15510-15516.
- Sawa, H., Kamada, K., Sato, H., Sendo, S., Kondo, A., Saito, I., . . . Obrink, B. (1994). C-CAM expression in the developing rat central nervous system. *Brain Res Dev Brain Res*, 78(1), 35-43.
- Sbarbati, A., Merigo, F., Benati, D., Tizzano, M., Bernardi, P., & Osculati, F. (2004). Laryngeal chemosensory clusters. *Chem Senses*, 29(8), 683-692. doi:10.1093/chemse/bjh071
- Sbarbati, A., & Osculati, F. (2005). A new fate for old cells: brush cells and related elements. *J Anat*, 206(4), 349-358. doi:10.1111/j.1469-7580.2005.00403.x
- Schild, L. (2010). The epithelial sodium channel and the control of sodium balance. *Biochim Biophys Acta*, 1802(12), 1159-1165. doi:10.1016/j.bbadis.2010.06.014
- Schutz, B., Jurastow, I., Bader, S., Ringer, C., von Engelhardt, J., Chubanov, V., . . . Weihe, E. (2015). Chemical coding and chemosensory properties of cholinergic brush cells in the mouse gastrointestinal and biliary tract. *Front Physiol*, 6, 87. doi:10.3389/fphys.2015.00087
- Slevogt, H., Zabel, S., Opitz, B., Hocke, A., Eitel, J., N'Guessan P, D., . . . Singer, B. B. (2008). CEACAM1 inhibits Toll-like receptor 2-triggered antibacterial responses of human pulmonary epithelial cells. *Nat Immunol*, 9(11), 1270-1278. doi:10.1038/ni.1661
- Sorg, D. A., & Buckner, B. (1964). A Simple Method of Obtaining Venous Blood from Small Laboratory Animals. *Proc Soc Exp Biol Med*, 115, 1131-1132.

- Stretton, D. (1991). Non-adrenergic, non-cholinergic neural control of the airways. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, *18*(10), 675-684.
- Sun, Y., Hu, G., Zhang, X., & Minshall, R. D. (2009). Phosphorylation of caveolin-1 regulates oxidant-induced pulmonary vascular permeability via paracellular and transcellular pathways. *Circ Res*, *105*(7), 676-685, 615 p following 685. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.201673
- Tallini, Y. N., Shui, B., Greene, K. S., Deng, K. Y., Doran, R., Fisher, P. J., . . . Kotlikoff, M. I. (2006). BAC transgenic mice express enhanced green fluorescent protein in central and peripheral cholinergic neurons. *Physiol Genomics*, *27*(3), 391-397. doi:10.1152/physiolgenomics.00092.2006
- Thompson, J. A. (1995). Molecular cloning and expression of carcinoembryonic antigen gene family members. *Tumour Biol*, *16*(1), 10-16.
- Thompson, J. A., Grunert, F., & Zimmermann, W. (1991). Carcinoembryonic antigen gene family: molecular biology and clinical perspectives. *J Clin Lab Anal*, *5*(5), 344-366.
- Tilki, D., Irmak, S., Oliveira-Ferrer, L., Hauschild, J., Miethe, K., Atakaya, H., . . . Ergun, S. (2006). CEA-related cell adhesion molecule-1 is involved in angiogenic switch in prostate cancer. *Oncogene*, *25*(36), 4965-4974. doi:10.1038/sj.onc.1209514
- Tizzano, M., Cristofolletti, M., Sbarbati, A., & Finger, T. E. (2011). Expression of taste receptors in solitary chemosensory cells of rodent airways. *BMC Pulm Med*, *11*, 3. doi:10.1186/1471-2466-11-3
- Tizzano, M., Gulbransen, B. D., Vandenbeuch, A., Clapp, T. R., Herman, J. P., Sibhatu, H. M., . . . Finger, T. E. (2010). Nasal chemosensory cells use bitter taste signaling to detect irritants and bacterial signals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *107*(7), 3210-3215. doi:0911934107 [pii] 10.1073/pnas.0911934107
- Veres, T. Z., Shevchenko, M., Krasteva, G., Spies, E., Prenzler, F., Rochlitzer, S., . . . Braun, A. (2009). Dendritic cell-nerve clusters are sites of T cell proliferation in allergic airway inflammation. *Am J Pathol*, *174*(3), 808-817. doi:10.2353/ajpath.2009.080800
- Vestweber, D. (2008). VE-cadherin: the major endothelial adhesion molecule controlling cellular junctions and blood vessel formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *28*(2), 223-232. doi:10.1161/ATVBAHA.107.158014
- Vincent, P. A., Xiao, K., Buckley, K. M., & Kowalczyk, A. P. (2004). VE-cadherin: adhesion at arm's length. *Am J Physiol Cell Physiol*, *286*(5), C987-997. doi:10.1152/ajpcell.00522.2003
- Voges, M., Bachmann, V., Kammerer, R., Gophna, U., & Hauck, C. R. (2010). CEACAM1 recognition by bacterial pathogens is species-specific. *BMC Microbiol*, *10*, 117. doi:10.1186/1471-2180-10-117
- Widdicombe, J. (2003). Functional morphology and physiology of pulmonary rapidly adapting receptors (RARs). *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*, *270*(1), 2-10. doi:10.1002/ar.a.10003
- Widdicombe, J. G. (1954). The site of pulmonary stretch receptors in the cat. *J Physiol*, *125*(2), 336-351.

- Widdicombe, J. G. (1954a). Receptors in the trachea and bronchi of the cat. *J Physiol*, 123(1), 71-104.
- Wiederhold, S., Papadakis, T., Chubanov, V., Gudermann, T., Krasteva-Christ, G., & Kummer, W. (2015). A novel cholinergic epithelial cell with chemosensory traits in the murine conjunctiva. *Int Immunopharmacol*, 29(1), 45-50. doi:10.1016/j.intimp.2015.06.027
- Wilhelm, D. L. (1973). Mechanisms responsible for increased vascular permeability in acute inflammation. *Agents Actions*, 3(5), 297-306.
- Yen, W. Y., Cai, B., Zeng, M., Tarbell, J. M., & Fu, B. M. (2012). Quantification of the endothelial surface glycocalyx on rat and mouse blood vessels. *Microvasc Res*, 83(3), 337-346. doi:10.1016/j.mvr.2012.02.005
- Yu, J., Wang, Y. F., & Zhang, J. W. (2003). Structure of slowly adapting pulmonary stretch receptors in the lung periphery. *J Appl Physiol (1985)*, 95(1), 385-393. doi:10.1152/jappphysiol.00137.2003
- Zancanaro, C., Caretta, C. M., Merigo, F., Cavaggioni, A., & Osculati, F. (1999). alpha-Gustducin expression in the vomeronasal organ of the mouse. *Eur J Neurosci*, 11(12), 4473-4475.

7 Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 1: Verwendete Chemikalien | 19 |
| Tabelle 2: Verwendete Geräte und Programme | 20 |
| Tabelle 3: Verwendete Präparationsinstrumente..... | 21 |
| Tabelle 4: Für die Immunfluoreszenzmarkierung verwendete Primärantikörper..... | 30 |
| Tabelle 5: Für die Immunfluoreszenzmarkierung verwendete Sekundärantikörper..... | 31 |
| Tabelle 6: Mittelwerte der gezählten neutrophilen Granulozyten..... | 50 |

8 Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1: Schematische Darstellung der Arbeitshypothese zur Entstehung einer neurogenen Entzündungsreaktion in den Atemwegen durch die Stimulation von Bürstenzellen mittels Cycloheximid..... | 18 |
| Abbildung 2: Perfusion - Abbildung modifiziert nach (Gage et al., 2012)..... | 26 |
| Abbildung 3: Aufteilung von Trachea und Bronchien bei der Entnahme..... | 27 |
| Abbildung 4: Schematische Darstellung der Dokumentationsweise..... | 32 |
| Abbildung 5: Immunhistochemie der Trachea mit Antikörpern gegen CGRP und DNA (DAPI). | 35 |
| Abbildung 6: Immunhistochemie eines Whole-Mount Präparats der Trachea mit Antikörpern gegen CGRP und DNA (DAPI). | 36 |
| Abbildung 7: Einfluss der Kanülenapplikation und der PBS-Gabe durch eine Kanüle auf die Plasmaextravasation in der Trachea und den extrapulmonalen Bronchien (Hauptbronchien) von WT- Mäusen, verglichen mit der Plasmaextravasation bei keiner Kanülenapplikation..... | 37 |
| Abbildung 8: Plasmaextravasation in Trachea und Bronchus bei WT- und CC1 ^{-/-} -Mäusen..... | 39 |

| | |
|---|----|
| Abbildung 9: Plasmaextravasation im mittlerer Trachealabschnitt und den Hauptbronchien bei WT- und CC1 ^{-/-} -Mäusen nach Verabreichung von PBS-Lösung..... | 40 |
| Abbildung 10: CGRP-Freisetzung nach Stimulation mit 10 mM Cycloheximid bei WT-Mäusen im Zeitverlauf..... | 41 |
| Abbildung 11: Einfluss von verschiedenen Cycloheximid-Konzentrationen auf die Plasmaextravasation in der mittleren Trachea bei WT- und CC1 ^{-/-} -Mäusen..... | 42 |
| Abbildung 12: Einfluss von verschiedenen Cycloheximid-Konzentrationen auf die Plasmaextravasation in den Bronchien bei WT- und CC1 ^{-/-} -Mäusen..... | 44 |
| Abbildung 13: Immunhistochemie der Trachea einer CC1 ^{-/-} -Maus nach Stimulation mit 10 mM Cycloheximid. | 45 |
| Abbildung 14: Immunhistochemie der Trachea mit Antikörpern gegen Endothelzellen (CD 31) und neutrophile Granulozyten (Ly6G-FITC). | 46 |
| Abbildung 15: Anzahl der neutrophilen Granulozyten im trachealen Abschnitt bei WT- und CC1 ^{-/-} -Mäusen nach Verabreichung von Cycloheximid in den Konzentrationen 100 µm, 1 mM 10 mM und PBS als Vehikel-Kontrolle. | 48 |
| Abbildung 16: Anzahl der neutrophilen Granulozyten im bronchialen Abschnitt bei WT und CC1 ^{-/-} -Mäusen nach Verabreichung von Cycloheximid in den Konzentrationen 100 µm, 1 mM 10 mM und PBS als Vehikel-Kontrolle. | 49 |

Danksagung

Im Folgenden möchte ich mich herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Professor Dr. Gabriela Krasteva-Christ für die Überlassung des Themas, die umfassende fachliche Betreuung und allzeitige Unterstützung. Auch für die vielen interessanten Gespräche und das freundschaftliche Verhältnis bin ich sehr dankbar.

Bei Herrn Dr. Rajender Nandigama möchte ich mich für die Unterstützung bei der Versuchsplanung und die Einarbeitung im Labor herzlich bedanken.

Weiterer Dank gebührt Frau Ursula Roth und Frau Dr. Verena Pfeiffer für die hilfreichen Ratschläge sowie die Unterstützung bei den Tierversuchen.

Bei Frau Lisa Berberich und Frau Erna Kleinschroth möchte ich mich für die Anleitung bei der Immunhistochemie sowie die unermüdliche Hilfe bei Problemen bedanken.

Ich danke allen Mitarbeitern des Instituts für die allzeit freundliche und hilfsbereite Unterstützung.

Der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Tatjana Kichko und Herrn Professor Dr. Peter Reeh möchte ich für die Peptidmessungen danken.

Meiner Mutter Dr. Jasmine Stabel-Burow danke ich für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Großer Dank gebührt meiner ganzen Familie, die mich immer unterstützt und motiviert hat.