

AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR INNERE MEDIZIN II  
DIREKTOR: PROF. DR. G. H. J. RIEGGER  
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Untersuchungen zur proinflammatorischen Wirkung  
cholinergischer Stimulation  
am humanen Bronchialepithel**

Inaugural - Dissertation  
Zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Monika Wacker

2010



AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR INNERE MEDIZIN II  
DIREKTOR: PROF. DR. G. H. J. RIEGGER  
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Untersuchungen zur proinflammatorischen Wirkung  
cholinergischer Stimulation  
am humanen Bronchialepithel**

Inaugural - Dissertation  
Zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Monika Wacker

2010

Dekan: Prof. Dr. Bernhard Weber

1. Berichterstatter: PD Dr. Christian Schulz

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Jonny Hobbhahn

Tag der mündlichen Prüfung: 28. Oktober 2010



Meiner Schwester Eva

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>8</b>
1.1	Definition der COPD	9
1.2	Epidemiologie und Mortalität	11
1.3	Risikofaktoren	12
1.3.1	<i>Zigarettenrauchen</i>	12
1.3.2	<i>Emissionen</i>	13
1.3.3	<i>Berufsbedingte inhalative Noxen</i>	14
1.3.4	<i>Virale und bakterielle Entzündungen</i>	15
1.3.5	<i>Alpha-1-Proteaseinhibitormangel</i>	16
1.3.6	<i>Soziale Faktoren</i>	16
1.3.7	<i>Geschlecht</i>	17
1.4	Pathologie, Pathogenese und Pathophysiologie	18
1.5	Das non-neuronale cholinerge System und seine Beteiligung an der COPD	23
1.6	Fragestellung	29
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>31</b>
2.1	Gewinnung der primären Bronchialepithelzellen	31
2.2	Zellbiologische Arbeitstechniken	32
2.2.1	<i>Anlegen einer Primärzellkultur</i>	32
2.2.2	<i>Kultivierung von BEAS 2 B</i>	35
2.3	Immunologische Arbeitstechniken	36
2.3.1	<i>Immunfluoreszenzmikroskopie</i>	36

2.4	Molekularbiologische Arbeitstechniken	38
2.4.1	<i>Stimulation der primären Bronchialepithelzellen auf 96-Well Platten</i>	38
2.4.2	<i>Vitalitätskontrolle</i>	40
2.4.3	<i>Stimulation in T25 (25 cm<sup>2</sup>)-Flaschen</i>	42
2.4.4	<i>Stimulation der Zelllinie</i>	43
2.4.5	<i>RNA-Isolierung</i>	44
2.4.6	<i>Aufreinigen der RNA</i>	45
2.4.7	<i>Herstellung von cDNA</i>	47
2.4.8	<i>Real-Time RT-PCR</i>	48
2.4.9	<i>IL-8-ELISA</i>	50
2.4.10	<i>Chemotaxis-Assay</i>	53
2.4.10.1	<i>Preparation der neutrophilen Granulozyten</i>	54
2.4.10.2	<i>Herstellung von ZAS (Zymosan aktiviertes Serum)</i>	55
2.4.10.3	<i>Beladen der Chemotaxis-Kammer</i>	56
2.4.10.4	<i>Checkerboard-Analyse</i>	57
2.4.11	<i>Calziumimaging</i>	58
2.5	Statistische Verfahren	60
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>61</b>
3.1	Patienten	61
3.2	Nachweis von M <sub>3</sub> -Rezeptoren auf primären humanen Bronchialepithelzellen	62
3.3	IL-8-ELISA der PBEC auf 96-Well Platten	63
3.3.1	<i>Basale IL-8-Produktion</i>	63
3.3.2	<i>Wirkung von TNF-<math>\alpha</math> auf die IL-8-Produktion</i>	65
3.3.3	<i>Wirkung von Carbachol auf die IL-8-Produktion</i>	67

3.4	IL-8-Produktion der primären Bronchialepithelzellen in T25-Zellkulturflaschen	69
3.5	Gleichzeitige Stimulation der PBEC mit Carbachol und TNF- $\alpha$ mittels Schachbretttitration	71
3.6	IL-8-Produktion der Zelllinie BEAS 2 B auf 96-Well Platten	73
3.6.1	<i>Basale IL-8-Produktion</i>	73
3.6.2	<i>Wirkung von TNF-<math>\alpha</math> auf die IL-8-Produktion</i>	73
3.6.3	<i>Wirkung von Carbachol auf die IL-8-Produktion</i>	74
3.7	IL-8-Produktion der Zelllinie BEAS 2 B in T25-Zellkulturflaschen	76
3.8	Gleichzeitige Stimulation der BEAS 2 B Zellen mit Carbachol und TNF- $\alpha$ mittels Schachbretttitration	78
3.9	Light Cycler-Auswertung der PBEC	80
3.10	Light Cycler-Auswertung der BEAS 2 B	83
3.11	Chemotaxis der PBEC	85
3.12	Calciumimaging	90
3.12.1	<i>Calciumimaging der PBEC</i>	91
3.12.2	<i>Calciumimaging der BEAS 2 B</i>	91
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>94</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>110</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>112</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>120</b>
<b>8</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>123</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung</b>	<b>124</b>
<b>10</b>	<b>Ehrenwörtliche Erklärung</b>	<b>125</b>