

**Ultrastrukturelle Untersuchungen an zilierten Zellen
im Respirationstrakt von Weißbüschelaffen (*Callithrix jacchus*)
mit und ohne Lungenerkrankungen**

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Grades einer
DOKTORIN DER VETERINÄRMEDIZIN
(Dr. med. vet.)
durch die Tierärztliche Hochschule Hannover

Vorgelegt von
Rebecca Marie Hoffmann
Bremerhaven

Hannover 2011

Bibliografische Information der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

Wissenschaftliche Betreuung: Univ.-Prof. Dr. F.-J. Kaup
Deutsches Primatenzentrum Göttingen,
Abteilung Infektiionspathologie

1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. F.-J. Kaup
Tierärztliche Hochschule Hannover,
Deutsches Primatenzentrum Göttingen

2.Gutachter: Univ.-Prof. B. Ohnesorge
Tierärztliche Hochschule Hannover, Klinik für Pferde

Tag der mündlichen Prüfung: 17.11.2011

Hoffmann, Rebecca Marie:

Ultrastrukturelle Untersuchungen an zilierten Zellen im Respirationstrakt von Weißbüschelaffen (*Callithrix jacchus*) mit und ohne Lungenerkrankungen

ISBN 978-3-941274-93-8

Alle Rechte vorbehalten

1. Auflage 2011, Göttingen

© Optimus Verlag

URL: <http://www.optimus-verlag.de>

© Coverfoto: Eye of Science GbR

URL: <http://www.eyeofscience.com/>

Printed in Germany

Papier ist FSC zertifiziert (holzfrei, chlorfrei und säurefrei, sowie alterungsbeständig nach ANSI 3948 und ISO 9706)

Das Werk, einschließlich aller seiner Teile, ist urheberrechtlich geschützt. Jede Verwertung außerhalb der engen Grenzen des Urheberrechtsgesetzes in Deutschland ist ohne Zustimmung des Verlages unzulässig und strafbar. Dies gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung und Verarbeitung in elektronischen Systemen.

Die Affen hier schulden uns nichts, aber wir ihnen alles.

J. Mahoney, Tuxedo, N.Y., 1995

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
2. LITERATURÜBERSICHT	3
2.1. Der Weißbüschelaffe (<i>Callithrix jacchus</i>)	3
2.1.1. Systematik und Vorkommen	3
2.1.2. Weißbüschelaffen in der biomedizinischen Forschung	3
2.2. Epithelzellen des Respirationstraktes	5
2.2.1. Zilierte Zellen des Respirationstraktes	5
2.2.2. Morphologie der zilierten Zellen	6
2.2.3. Verteilung der zilierten Zellen im Respirationstrakt	6
2.2.4. Ultrastruktur der Zilien	8
2.2.5. Funktion und Bewegungsmechanismus der Zilien	11
2.2.6. Ziliogenese	12
2.2.7. Pathologische Veränderungen der Zilien	13
2.2.7.1. Kongenitale Defekte der ziliären Struktur	13
2.2.7.2. Sekundäre, erworbene Defekte der ziliären Struktur	15
3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	21
3.1. Material und Methoden	21
3.1.1. Tiermaterial und Haltungsbedingungen	21
3.1.2. Sektion und Probengewinnung	21
3.1.3. Gewebepräparation	22
3.1.4. Elektronenmikroskopische Präparation	23

3.1.4.1. Transmissionselektronenmikroskopische Präparation	23
3.1.4.2. Rasterelektronenmikroskopische Präparation.....	24
3.1.5. Histologische Präparation.....	24
3.1.6. Morphologische Auswertungen	25
3.1.6.1. Lichtmikroskopie	25
3.1.6.2. Transmissionselektronenmikroskopie.....	26
3.1.6.3. Rasterelektronenmikroskopie.....	26
3.1.7. Statistik	26
4. ERGEBNISSE.....	29
4.1. Lichtmikroskopie	29
4.2. Elektronenmikroskopie	32
4.2.1. Ultrastruktur der zilierten Zellen beim Weißbüschelaffen.....	32
4.2.2. Ultrastrukturelle Veränderungen der zilierten Zellen beim Weißbüschelaffen.....	34
4.2.3. Statistische Auswertungen zum Auftreten ziliärer Veränderungen	35
4.3. Verteilung der zilierten Zellen in der Trachea beim Weißbüschelaffen.....	52
5. DISKUSSION.....	57
6. ZUSAMMENFASSUNG	67
7. SUMMARY	69
8. LITERATURVERZEICHNIS.....	71
9. ANHANG.....	85
9.1. Anhangstabellen.....	85
9.1.1. Tiermaterial	85

9.2. Statistische Auswertungen	86
9.2.1. Tabellen der ultrastrukturellen Auszählungen	86
9.2.2. SPSS-Auswertungen.....	91
9.2.3. SAS-Auswertungen	98
9.3. Protokolle für die Histologie.....	99
9.3.1. Paraffin-Einbettungsprotokoll	99
9.3.2. Phosphatpuffer.....	99
9.3.3. Fixierlösungen	100
9.3.4. Histologische Färbungen an Paraffinschnitten.....	101
9.3.5. Hämalaun und Eosin-Färbung	101
9.4. Protokolle für die Transmissionselektronenmikroskopie	102
9.4.1. Eponmischung nach LUFT (1961).....	102
9.4.2. Eponeinbettung.....	102
9.4.3. Methylenblaufärbung nach RICHARDSON et al. (1960)	103
9.5. Göttinger Mischung 2	103

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
<i>Aqua bidest.</i>	doppelt destilliertes Wasser
<i>Aqua dest.</i>	destilliertes Wasser
<i>Aqua ad injectionem</i>	Wasser für Injektionszwecke
ATPase	Adenosintriphosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
bzw.	beziehungsweise
C. adh	Compound Cilia vom “adhesive type”
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
C. bulg	Compound Cilia vom “bulging type”
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
ciltail	Ciliary tail
COPD	“chronic obstructive pulmonary disease“
DPZ	Deutsches Primatenzentrum
Dys	Dysorientierung der mikrotubulären Struktur
EM	Elektronenmikroskopie
et al.	und Mitarbeiter
EV	Elektronenmikroskopischer Vergrößerungsfaktor
Extratub	Extratubuli
ExM	Extramatrix
Geschl.	Geschlecht
ggr.	geringgradig
Gr.	Gruppe
GS	Gesundheitsstatus
HB	Hauptbronchus
H.E.	Hämalaun-Eosin-Färbung

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

hgr.	hochgradig
Hyp-Mutation	„hydrocephalic-polydactyl“-Mutation
ICS	„immotile cilia syndrome“
J.	Jahre
k. A.	keine Angabe
KGW	Körpergewicht
L	Lunge
LPS	Lipopolysaccharide
M.	Monate
mgr.	mittelgradig
ml	Milliliter
mm/min	Millimeter/Minute
o.b.B.	ohne besonderen Befund
PCLS	“Precision Cut Lung Slices“
REM	Rasterelektronenmikroskopie
Tab.	Tabelle
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
T	Trachea
TT	Trächtigkeitstag
TNF-alpha	Tumornekrosefaktor-alpha
Veränd.	Veränderungen
W.	Wochen
ZV	Zilienveränderungen

1 EINLEITUNG

Seit geraumer Zeit ist bekannt, dass die zilierten Zellen im Respirationstrakt eine wichtige Rolle bei dem Schutz der Atemwege spielen. Aus diesem Grund wurden umfangreiche Untersuchungen zur Analyse und Charakterisierung der Funktion und Morphologie des zilierten Epithels durchgeführt. Vor allem seit der Einführung der Elektronenmikroskopie ist das mukoziliäre System Gegenstand zahlreicher Untersuchungen und Publikationen. Bei Defekten des Flimmerepithels kommt es zu einer Einschränkung der mukoziliären Clearance und damit zu einer Sekretretention. Solche Ziliendefekte können autosomal-rezessiv vererbt werden und damit von Geburt an vorhanden sein. Darüber hinaus können diverse Noxen zu einer sekundären, erworbenen Ziliendyskinesie führen. Sekundäre Veränderungen der Zilien sind auch im Respirationstrakt gesunder Menschen und Tiere beschrieben.

In dieser Arbeit wurden die Zahl und die Morphologie der Zilien und Zilienveränderungen von 32 Weißbüschelaffen (*Callithrix jacchus*) unterschiedlicher Altersstufen transmissionselektronenmikroskopisch untersucht. Da Marmosets in Gefangenschaftshaltung vermehrt an chronischen Atemwegserkrankungen in Form von interstitiellen Pneumonien leiden, sollte weiterhin geklärt werden, inwieweit diese auch vermehrt mit ultrastrukturellen Veränderungen an den Zilien des Respirationsepithels einhergehen. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Beantwortung der Frage, ob und wenn ja, welche Veränderungen der Zilien des respiratorischen Epithels auftreten.

Hintergrund ist die Tatsache, dass Weißbüschelaffen in der COPD/Asthma-Forschung als Tiermodelle für chronische Atemwegserkrankungen des Menschen eingesetzt werden. Dabei ist denkbar, dass im Rahmen derartiger Untersuchungen auch Biopsien mit ultrastruktureller Auswertung notwendig sind. Damit tragen die Ergebnisse dieser Arbeit zur Validierung dieses Tiermodells, zur Generierung von Referenzdaten und zur Vermeidung von Fehlinterpretationen, insbesondere in Bezug auf sekundäre Veränderungen der Zilien, bei.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Der Weißbüschelaffe (*Callithrix jacchus*)

2.1.1 Systematik und Vorkommen

Der Weißbüschelaffe, *Callithrix jacchus*, gehört als Vertreter der Familie der Krallenaffen (*Callitrichidae*) zu den vom amerikanischen Kontinent stammenden Neuweltaffen (*Platyrrhini*). Die Krallenaffen zeichnen sich durch die typische namensgebende Ausbildung von Krallen an allen Zehen mit Ausnahme der Großzehe aus (WOLTERS u. IMMELMANN 1988) und werden in sechs Gattungen unterteilt (NEUSSER et al. 2001). Unter dem Begriff der Marmosetten (französisch „marmoset“, Knirps/Zwerg) werden die Gattungen *Cebuella*, *Mico* und *Callithrix* zusammengefasst, wobei der Weißbüschelaffe der letztgenannten Gattung angehört. Alle drei nah miteinander verwandten Gattungen nagen zur Aufnahme zähflüssigen Baumsaftes kleine Löcher in die Baumrinde und zeichnen sich deshalb durch eine besondere Gebissform aus. Sie besitzen vergrößerte Incisivi und verkürzte Canini, so dass alle Zähne im Vordergebiss etwa gleich hoch sind (GEISSMANN 2003).

Das äußere Erscheinungsbild des Weißbüschelaffen wird durch die typischen abstehenden weißen Ohrbüschel und den weißen Stirnfleck geprägt. Das graubraune Rückenfell zeigt eine helle Querbänderung, die sich vor allem im Schwanzbereich sehr deutlich zeigt (WOLTERS u. IMMELMANN 1988). Die Körpergröße eines ausgewachsenen Weißbüschelaffen liegt bei durchschnittlich 25 cm bei einem Gewicht von 300 - 450 Gramm und die Schwanzlänge beträgt durchschnittlich 28 cm. Der *Callithrix jacchus* zeigt keinen deutlichen Geschlechtsdimorphismus bezüglich Gewicht, Größe oder Erscheinungsbild (RICHTER 1984).

Weißbüschelaffen sind ursprünglich im äußersten Nordosten Brasiliens beheimatet und wurden von dort aus durch den Menschen in die atlantischen Regenwälder im Südosten Brasiliens gebracht. Aufgrund ihrer hohen Anfassungsfähigkeit gehören die Weißbüschelaffen, trotz fortschreitender Zerstörung ihres Habitats, zu den wenigen nicht vom Aussterben bedrohten Krallenaffenarten (WOLTERS u. IMMELMANN 1988).

2.1.2 Weißbüschelaffen in der biomedizinischen Forschung

Im letzten Jahrzehnt wurden die Weißbüschelaffen weltweit als Labortiere etabliert. Die Vorteile dieser Primatenspezies liegen in ihrer hohen Anpassungsfähigkeit, dem

niedrigen zoonotischen Potential ihres Erregerspektrums, einer wenig kostenintensiven Haltung im Vergleich zu anderen nicht-humanen Primaten und der hohen Reproduktionsrate. Eingesetzt werden die Weißbüschelaffen vor allem im Bereich der Neurowissenschaften, der Reproduktionsbiologie, der Infektionsforschung, der Verhaltensforschung und im Rahmen von Arzneimittelstudien. Mittlerweile gibt es aufgrund zahlreicher Untersuchungen umfangreiche Informationen bezüglich der Biologie und Physiologie von Weißbüschelaffen (MANSFIELD 2003).

SURRIBAS et al. veröffentlichten 1987 eine morphologische Studie zum Respirationstrakt des *Callithrix jacchus*. In dieser Arbeit wurde der Respirationstrakt von sieben Weißbüschelaffen morphologisch untersucht. Die Nasenhöhle ist beim *Callithrix jacchus* in drei Abschnitte unterteilt: den Nasenvorhof (ausgekleidet mit nichtverhorntem Plattenepithel), den respiratorischen Abschnitt (ausgekleidet mit ziliertem Epithel und Becherzellen) und die olfaktorische Region (ausgekleidet mit ziliertem Epithel ohne Becherzellen). Die Trachea enthält ein mehrreihiges, ziliertes Zylinderepithel mit sehr wenigen Becherzellen in der proximalen Region. Die rechte Lunge besteht aus drei und die linke Lunge aus zwei Lappen, die nicht in Läppchen unterteilt werden. Das Epithel besteht, ebenso wie bei anderen Säugern, aus mehrreihigem Flimmerepithel, und die knorpeligen Anteile der luftführenden Wege setzen sich, im Gegensatz zu anderen Säugetieren, bis in die respiratorischen Bronchiolen und Alveolargänge fort (SURRIBAS u. LAWZEWITSCH 1987).

In der Abteilung Infektionspathologie des Deutschen Primatenzentrums (DPZ) beschäftigt sich die „Arbeitsgruppe Respirationskrankheiten“ mit der weiterführenden morphologischen Charakterisierung des Atmungsapparates von Weißbüschelaffen. Die ultrastrukturelle Untersuchung der zilierten Zellen des Atmungstraktes von gesunden und kranken Tieren ist Teil dieses Projektes. Zusammen mit dem Fraunhofer Institut für Toxikologie und Experimentelle Medizin (ITEM) Hannover und der Abteilung Klinische Neurobiologie des Deutschen Primatenzentrums Göttingen wird die Etablierung des Weißbüschelaffen als Tiermodell für COPD/Asthma des Menschen angestrebt. An „Precision Cut Lung Slices“ (PCLS) und nach intrabronchialer *in vivo* Stimulation werden die Auswirkungen von Lipopolysacchariden (LPS) auf die Zytokinsekretion und TNF-alpha Freisetzung unter unterschiedlichen Bedingungen gemessen. Die ersten Ergebnisse zeigen, dass das Lungengewebe von Marmosets größere Ähnlichkeit zum humanen Gewebe als das von anderen Labortieren zeigt und bei einer Dexamethason-Behandlung im Reaktionsmuster dem vom humanen PCLS entspricht (LAUENSTEIN et al. 2011).

Bronchokonstriktion stellt ein charakteristisches Symptom einer Vielzahl von chronisch obstruktiven pulmonären Erkrankungen, wie zum Beispiel der COPD, dar.

PCLS eignen sich gut, um die physiologischen Mechanismen der Bronchokonstriktion bei verschiedenen Spezies *ex vivo* darzustellen. SEEHASE et al. (2011) etablierten dieses *ex vivo* Modell für nicht-humanen Primaten. Es konnte gezeigt werden, dass die Lunge vom Marmoset in Bezug auf die Bronchokonstriktion eine größere Ähnlichkeit zum humanen Gewebe zeigt als die Lunge von anderen Labortieren (SEEHASE et al. 2011).

2.2 Epithelzellen des Respirationstraktes

Das Flimmerepithel im Atmungstrakt von Säugetieren besteht aus verschiedenen Zelltypen. Neben den nicht-zilierten, sekretorischen Zellen, die in erster Linie für die Sekretion von Bestandteilen der Mukusschicht verantwortlich sind, nehmen die zilierten Zellen der oberen Luftwege eine wichtige Funktion im Rahmen des mukoziliären Clearance-Mechanismus ein. Zu den wichtigsten nicht-zilierten Zellen des Atmungstraktes gehören die Becherzellen, die einen viskosen Schleim produzieren, die Clara-Zellen, die vor allem Surfactant-Proteine sezernieren, die Basalzellen, die als pluripotente Stammzellen dienen, die neuroendokrinen Zellen, die VIP (vasoaktives intestinales Peptid), Bombesin, Serotonin und andere Botenstoffe sezernieren, und die Bürstenzellen, die basal mit Axonen assoziiert sind und Sinneszellen darstellen (TOMASHEFSKI u. FARVER 2008).

Beim Menschen existieren in der Umgebung einer mukus-produzierenden Zelle durchschnittlich fünf zilierte Zellen (ENGSTROM 1951; RHODIN 1966).

2.2.1 Zilierte Zellen des Respirationstraktes

Bei höher entwickelten Tierarten wie den Säugetieren kommen zilierte Zellen in verschiedenen Epitheltypen vor. Zu finden sind sie in der Nasenschleimhaut (mit Ausnahme der *Regio olfactoria* und der vorderen Nasenabschnitte), dem Tracheobronchialsystem, der Eustachischen Röhre, den Ependymzellen des zentralen Nervensystems, der *Tuba uterina*, der Retina, den *Ductuli efferentes* des Nebenhodens sowie modifiziert als Spermenschwanz (AFZELIUS 1976b).

Große Areale des Respirationstraktes sind mit ziliertem Epithel bedeckt. Nach Literaturangaben bedeckt dieses Epithel ca. $0,5 \text{ m}^2$ des humanen Atmungstraktes. Da sich auf $1 \mu\text{m}^2$ ungefähr sechs Zilien befinden, beträgt die Gesamtzahl der Zilien im menschlichen Körper etwa 3×10^{12} (AFZELIUS 1982; NÜßLEIN 2001).

Nach OHASHI und NAKAI (1983) werden aufgrund der unterschiedlichen Elektronendichte des Zytoplasmas zwei Typen der zilierten Zellen beschrieben. Zellen mit wenig elektronendichtem Zytosol werden als „clear ciliated cells“ angesprochen, während Zellen mit viel elektronendichtem Zytosol als „dark