

Aus dem Institut für Anatomie
Universität Bern

Direktor: Prof. Dr. med. Valentin Djonov
Arbeit unter der Leitung von PD Dr. med. Stefan A. Tschanz

Funktionelle und strukturelle Analyse der primären ziliären Dyskinesie – Retrospektive auf 35 Jahre diagnostische Tätigkeit

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der
Humanmedizin der Medizinischen Fakultät der Universität Bern

vorgelegt von

Jonas K. Ingold

aus Inkwil BE

Originaldokument gespeichert auf dem Webserver der Universitätsbibliothek Bern



Dieses Werk ist unter einem
Creative Commons Namensnennung-Keine kommerzielle Nutzung-Keine Bearbeitung 2.5
Schweiz Lizenzvertrag lizenziert. Um die Lizenz anzusehen, gehen Sie bitte zu
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ch/> oder schicken Sie einen Brief an
Creative Commons, 171 Second Street, Suite 300, San Francisco, California 94105, USA.

Urheberrechtlicher Hinweis

Dieses Dokument steht unter einer Lizenz der Creative Commons
Namensnennung-Keine kommerzielle Nutzung-Keine Bearbeitung 2.5 Schweiz.
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ch/>

Sie dürfen:



dieses Werk vervielfältigen, verbreiten und öffentlich zugänglich machen

Zu den folgenden Bedingungen:



Namensnennung. Sie müssen den Namen des Autors/Rechteinhabers in der von ihm festgelegten Weise nennen (wodurch aber nicht der Eindruck entstehen darf, Sie oder die Nutzung des Werkes durch Sie würden entlohnt).



Keine kommerzielle Nutzung. Dieses Werk darf nicht für kommerzielle Zwecke verwendet werden.



Keine Bearbeitung. Dieses Werk darf nicht bearbeitet oder in anderer Weise verändert werden.

Im Falle einer Verbreitung müssen Sie anderen die Lizenzbedingungen, unter welche dieses Werk fällt, mitteilen.

Jede der vorgenannten Bedingungen kann aufgehoben werden, sofern Sie die Einwilligung des Rechteinhabers dazu erhalten.

Diese Lizenz lässt die Urheberpersönlichkeitsrechte nach Schweizer Recht unberührt.

Eine ausführliche Fassung des Lizenzvertrags befindet sich unter
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ch/legalcode.de>

Von der Medizinischen Fakultät der Universität Bern auf Antrag
der Dissertationskommission als Dissertation genehmigt.

Promotionsdatum:

Der Dekan der Medizinischen Fakultät:

1 Zusammenfassung

Die primäre ziliäre Dyskinesie (engl. *Primary ciliary dyskinesia* - PCD) ist eine seltene genetische Erkrankung, welche in erster Linie durch chronische pneumologische Probleme charakterisiert wird und pathophysiologisch Folge einer verminderten mukoziliären Clearance ist. Insbesondere besteht die Schwierigkeit bei dieser klinisch sich oft sehr früh und unspezifisch manifestierenden Erkrankung in der Diagnosestellung, weswegen wir auf zuverlässige diagnostische Methoden angewiesen sind.

Die Vitalanalyse mittels Lichtmikroskop (*high speed video microscopy analysis* [HSVA]) gewann dabei im Verlauf, umso mehr als die technische Verfügbarkeit von schnellen Aufnahmesystemen zu akzeptablen Preisen eine detaillierte Analyse der Motilität erlaubte, an Bedeutung gegenüber der zuvor als Goldstandard angesehenen Transmissions-elektronenmikroskopie [TEM].

In der vorliegenden Arbeit soll die Erfahrung im Bereich funktionell-strukturelle PCD Analytik, die in den letzten 35 Jahre am Institut für Anatomie gesammelt werden konnte, systematisch zusammengetragen und analysiert, sowie ein Leitfaden für das technische Prozedere präsentiert werden.

Abkürzungen

PCD	Primäre Ziliäre Dyskinesie (<i>primary ciliary dyskinesia</i>)
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
LM	Lichtmikroskop
ODA	Äusserer Dyneinarm (<i>outer dynein arm</i>)
IDA	Innerer Dyneinarm (<i>inner dynein arm</i>)
CP	Zentrales Tubuluspaar (<i>central pair</i>)
HSVA	Hochgeschwindigkeits-Videomikroskopie (<i>high speed video microscopy analysis</i>)
NO	Stickoxyd (<i>nitric oxide</i>)
CBF	Zilienschlagmuster (<i>ciliary beat frequency</i>)
CBF	Zilienschlagfrequenz (<i>ciliary beat frequency</i>)
FPS	Bilder pro Sekunde (<i>frames per second</i>)

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	4
2.1	Struktur und Funktion der Kinozilien	6
2.1.1	Zilienstruktur	6
2.1.2	Zilienfunktion	9
2.2	Genetik der PCD	11
2.3	Klinik der PCD	13
2.4	Diagnose der PCD	14
2.4.1	Screening Tests	14
2.4.2	Ultrastruktur (TEM).....	15
2.4.3	Videoanalyse (HSVA).....	17
2.4.4	Genetische Analytik.....	18
2.4.5	Immunfluoreszenz	18
3	Methoden	19
3.1	Datenerhebung für diese Studie.....	19
3.2	Strukturell-funktionelle PCD Diagnostik in Bern	20
3.2.1	Vitalanalyse (HSVA).....	20
3.2.2	Ultrastrukturanalyse (TEM).....	23
4	Resultate	24
4.1	Strukturelle und funktionelle Befunde Gesamtkohorte	27
4.1.1	Zeiteinflüsse	28
4.1.2	Temperatur.....	28
4.2	Strukturelle und funktionelle Befunde bei PCD Betroffenen.....	29
4.3	Klinisch-anamnestischer Kontext PCD Betroffener	32
5	Diskussion	35
5.1	Problematik der PCD Diagnostik.....	36
5.1.1	Anforderungen an die Gewebeentnahme	36
5.1.2	Präparatorische Anforderungen	37
5.1.3	Anforderungen an die Datenerhebung und Dateninterpretation.....	38
5.1.4	Technische Anforderungen	41
5.2	Praktischer Leitfaden.....	42
5.3	Abschliessende Bemerkung.....	45
6	Danksagungen	46
7	Literaturverzeichnis	47

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: TEM Aufnahme humane Trachea.....	6
Abbildung 2: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme Flimmerepithel	7
Abbildung 3: Querschnitt Kinozilium.....	8
Abbildung 4: Immunfluoreszenzaufnahme menschliches Flimmerepithel.....	9
Abbildung 5: Schematische Darstellung des Zilienschlagzyklus - Seitenansicht.	9
Abbildung 6: Schematische Darstellung des Zilienschlagzyklus - Aufsicht.....	10
Abbildung 7: Liste identifizierter Genmutationen bei PCD.	12
Abbildung 8: ODA und IDA Defekte	16
Abbildung 9: Transpositionen.....	17
Abbildung 10: Brushes zur nasalen Entnahme von Flimmerepithel.....	21
Abbildung 11: Anzahl Analysen.....	25
Abbildung 12: Relation nasale zu bronchialer Probeentnahme	25
Abbildung 13: Relation Vital zu TEM Analyse,.....	26
Abbildung 14: Analysealter.....	26
Abbildung 15: CBF Zeitserien	28
Abbildung 16: TEM Befunde bei PCD	31
Abbildung 17: CP-Defekte, sekundär	32
Abbildung 18: Alter bei PCD Diagnose	33
Abbildung 19: Frequenzinhomogenitäten.....	39
Abbildung 20: PCD Diagnoseschema Bern	42

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Manifestationen und Symptome bei PCD.....	14
Tabelle 2: Checkliste anamnestische Daten	20
Tabelle 3: Übersicht der Analysetätigkeit 1981-2015.....	24
Tabelle 4: Strukturell-funktionelle Befunde bei PCD	30
Tabelle 5: PCD Anamnese.....	34

2 Einleitung

Die primäre ziliäre Dyskinesie (engl. *Primary ciliary dyskinesia* - PCD) ist eine seltene, autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung, welche in erster Linie durch chronische pneumologische Probleme charakterisiert wird und pathophysiologisch Folge einer verminderten mukoziliären Clearance ist¹⁻⁶.

1904 präsentierte Siewert erstmalig einen Fall eines Patienten mit Sinusitis und Situs inversus⁷. 1933 kamen in der Beschreibung von Manus Kartagener noch die bronchographisch diagnostizierten Bronchiektasen hinzu, zur Formung der berühmten Kartagener-Trias, welche nach wie vor oft Synonym für die ziliäre Dyskinesie verwendet wird^{8,9}.

Erst 1976 assoziierte Björn Afzelius den Symptomenkomplex mit der Immotilität der Kinozilien^{1,10,11} und führte den Begriff *Immotile cilia syndrome* – ICS ein. Er stellte Veränderungen in der mikrotubulären Struktur der Kinozilien, dem sogenannten Axonem¹² und dem Dynein^{13,14} fest. Zunächst wurde – entsprechend der Bezeichnung – von einer kompletten Immotilität ausgegangen. Etwas später wurde festgestellt, dass auch verschiedene Schweregrade der Motilitätsstörung, ohne kompletten Arrest, die mukoziliäre Funktion relevant einschränken und es wurde die Bezeichnung primäre ziliäre DYSKINESIE eingeführt^{15,16}.

Die klassische Symptomatologie der PCD ist auf das Fehlen einer adäquaten Motilität zurückzuführen, welche effiziente Transportphänomene verhindert. Entsprechend sind die Organsysteme betroffen, welche substanziiell Flimmerepithel enthalten: der Luftwegsbaum des Atemtraktes, die Keimwege (*tuba uterina, ductuli efferentes*) und die Spermien. Kinozilien, ob motile oder physiologisch amotile, finden sich an einer Vielzahl von Zellen im Säugetier. Neben den oben erwähnten Hauptlokalisationen, sind Kinozilien in fast allen Zelltypen beschrieben worden, oft als sogenannte Primärzilien mit sensorischer Funktion¹⁷. So als embryonaler Organisator im Primitivknoten^{18,19} (→ Situs Inversus und andere Entwicklungsstörungen), in Nierenzellen^{20,21} (→ Polyzystische Nierenerkrankung), Endothelzellen¹⁷, Ependymzellen²² (→ Hydrocephalus internus) und in vielen sensorischen Zellen (Auge, Nase, Ohr). Das Spektrum der zilien-assoziierten Erkrankungen, den sog. Ziliopathien, ist daher sehr breit, wobei die auf sensorische Funktionsstörungen basierenden Leiden noch seltener sind als die motilitätsabhängigen mit Bezug zur Lunge²³.

Die Prävalenz der PCD wird mit 1:10'000 bis 1:20'000 angegeben, unter anderem basierend auf Extrapolationen radiologischer Studien aus Norwegen und Japan²⁴⁻²⁷. Basierend auf diesen Prävalenzannahmen muss davon ausgegangen werden, dass PCD massiv unterdiagnostiziert ist und eine frühzeitige Diagnose wichtig wäre, um Langzeitschäden vorzubeugen^{6,28,29}. Diese Verzögerung in der Diagnosestellung ist sicher auch mit dem sehr unterschiedlichen Symptomenspektrum und Manifestationsgrad zusammenhängend (siehe:

"Klinik der PCD"). Die letzten verfügbaren Morbiditätsdaten aus der Schweiz (2010) gehen von 65 lebenden Patienten aus²⁸, was einer Prävalenz von grob über 1:120'000 entsprechen würde (Bevölkerung der Schweiz 2010: 7.852 Millionen) und 5 – 10 x zu tief liegt!

Da die PCD eine genetische Störung ist, bestehen zurzeit keine kausalen therapeutischen Ansätze. Dennoch ist eine adäquate Diagnostik unumgänglich, da dadurch initiierte spezifische Therapieschemata den Verlauf von PCD-Betroffenen deutlich verbessern³⁰.

In der vorliegenden Arbeit soll die Erfahrung, die aufgrund der funktionell-strukturellen PCD Analytik der letzten 35 Jahre am Institut für Anatomie gesammelt werden konnte, systematisch zusammengetragen und analysiert werden. Zunächst wird eine Bestandsaufnahme des aktuellen Kenntnisstandes der PCD und im Speziellen der PCD Diagnostik durchgeführt. Es werden die diagnostischen Konzepte aufgezeigt, die im PCD Diagnostikzentrum des Institutes für Anatomie Bern, angewandt werden. Die in Bern erhobenen Befunde und kursorisch anamnestische Daten werden in den Kontext der Literatur gesetzt. Die diagnostischen Erfahrungen aus 35 Jahren Tätigkeit werden diskutiert und in der Folge Richtlinien und Konzepte zur Verbesserung der PCD Diagnostik ausgesprochen, welche noch viele offene Punkte beinhaltet.

2.1 Struktur und Funktion der Kinozilien

2.1.1 Zilienstruktur

Kinozilien sind Ausstülpungen der Plasmamembran, welche ein filamentäres Gerüst aus Mikrotubuli besitzen. Die Grundstruktur dieses Gerüsts entspricht der Anordnung der Mikrotubuli in den Zentriolen. Während der Mitose stellen sie als Zentrosomen den Sammelpunkt des Spindelapparates dar. Als Basalkörper (*basal bodies*) bilden sie nahe der Plasmamembran die Basis der sich darüber befindlichen Zilien.

Bewegliche Zilien, im deutschen Sprachraum auch Flimmerhaare genannt, weisen im Atemtrakt einen Durchmesser von 250nm und Längen von 5 – 10µm auf. Jede zilientragende Zelle, Flimmerepithelzelle genannt, kann bis mehrere 100 Kinozilien aufweisen (Abbildung 1 und Abbildung 2).

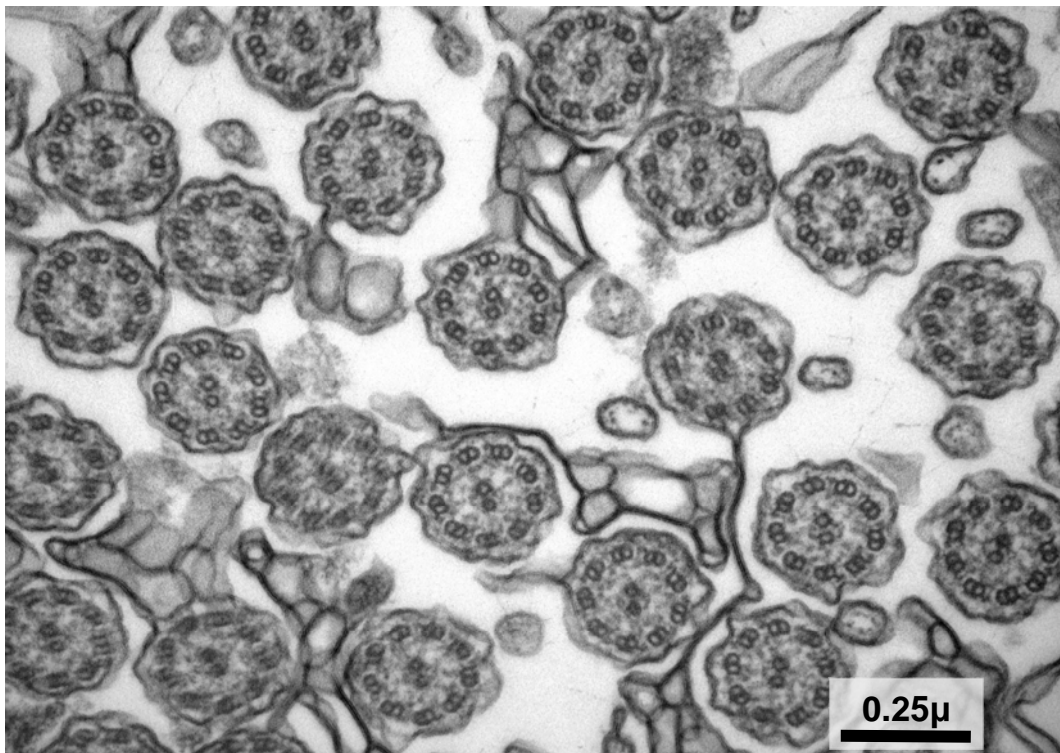


Abbildung 1: TEM Aufnahme humane Trachea.
Querschnitt durch mehrere Kinozilien (tangential zum Zellapex).

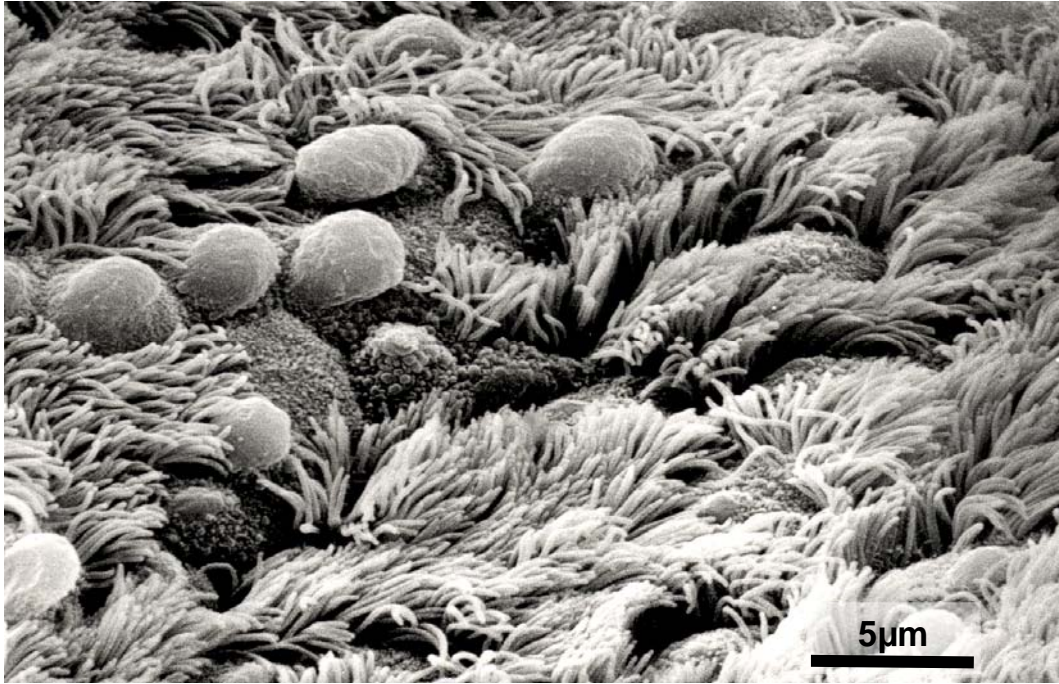


Abbildung 2: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme Flimmerepithel Bronchus, Mensch. Zilienbesetzte Zellen, Becherzellen

In Querschnitten von Kinozilien (Abbildung 3) ist die hochorganisierte Struktur des zytoskelettalen Gerüsts, hier Axonem genannt, gut zu erkennen. Einsicht in diese Struktur erlaubt die Elektronenmikroskopie, mit welcher kurz nach deren Erfindung der axonemale Aufbau beschrieben wurde^{31,32}. Die rhythmische Beweglichkeit der Kinozilien ist Folge eines aktiven, energieabhängigen und koordinierten Gleitmechanismus der Mikrotubuli jeder einzelnen Zilie³³. Verantwortlich für das Gleiten sind die Dyneine, welche eine der beiden Motorproteinklassen des mikrotubulären Systems darstellen und in Interaktion mit dem Tubulin die Zilienbewegung erzeugen^{34,35}. Die Kinesine scheinen in der Zilienmotilität direkt keine relevante Rolle zu spielen. Gemäss neusten Erkenntnissen sind sie aber für den intraflagellaren Transport (IFT) wichtig, welcher den Zusammenbau der Kinozilien verantwortet³⁶.

Die Grundstruktur eines Ziliums ist im Querschnitt durch eine streng definierte radspeichenartige Anordnung von 9 peripheren Doppeltubuli und einem zentralen Tubuluspaar gegeben [9x2 + 2 Muster] (Abbildung 3). Die Tubuli des zentralen Paares sind einzeln abgrenzbar, während die peripheren Tubulus – "Paare" aus einem vollständigen A Tubulus (hellblau in Abbildung 3) und einem angeflanschten, unvollständigen B Tubulus (dunkelblau in Abbildung 3) bestehen^{37,38} und also de facto kein komplettes Paar bilden. Die Orientierung der A-B Tubulusverbindung ist organismusweit fixiert. Das Axonem wird dadurch chiral und rotationsasymmetrisch³⁹⁻⁴¹. Demzufolge wird es möglich eine klare Sequenz der peripheren Doppeltubuli zu bestimmen, welche eine definierte Aufzählung von 1 – 9 erlaubt⁴².

Weiter kann eine Seite beim Tubuluspaar 1 und eine Gegenseite zwischen den Tubuluspaaren 5 und 6 ("*5-6 bridge*" in Abbildung 3) bestimmt werden. Dies ist funktionell sehr wichtig, da dadurch die Ebene und Richtung des Zilienschlages strukturell zugeordnet werden kann: Die Ebene steht senkrecht zu einer Linie durch die beiden Zentraltubuli (Alternativ zwischen Tubulus 1 und 5-6 Übergang) und die Schlagrichtung der aktiveren Schlagkomponente geht von Tubulus 1 Richtung 5-6 Übergang.

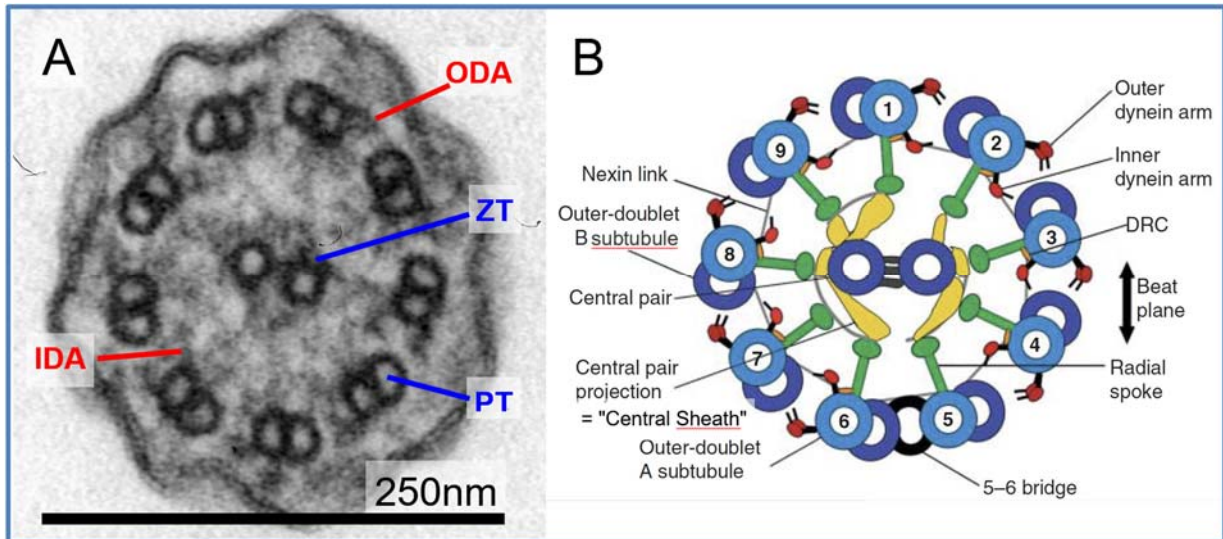


Abbildung 3: Querschnitt Kinozilium.

A: TEM Aufnahme, Trachea, Mensch, PT periphere Tubuli, ZT: zentrales Tubuluspaar, IDA: innere Dyneinarme, ODA: äussere Dyneinarme. B: schematische Darstellung aus Lindemann & Lesich 2015³⁵

Die Dyneine befinden sich am vollständigen A Tubulus. Die Ordnung der Tubuluspaare untereinander wird durch die "Radial Spokes" (grün in Abbildung 3 B) unterstützt. Der innen liegende Knopf wird "*Spoke Head*" genannt. Weitere diskriminierbare Strukturen sind die zentrale Hülle ("*Central Sheath*"), der "*Nexin Link*" und der DRC ("*Dynein Regulatory Complex*"). Funktionell sind die Dyneine besonders wichtig, was sich auch in der breiten Palette an genetischen Mutationen ablesen lässt, die für PCD verantwortlich gemacht werden (siehe "Genetik der PCD").

Die Transmissionselektronenmikroskopie [TEM] erlaubt nach wie vor den detailliertesten Einblick in die axonemale Struktur, wobei keine molekularbiologischen Zuordnungen möglich sind. Mittels Kryo-Tomographie Elektronenmikroskopie ist ein immer tieferer Einblick in den molekularen Aufbau möglich, besonders im Bereich der Dynein-Tubulin Interaktion, was auch die molekulare Modellierung einschliesst^{37,38,43,44}. Immunfluoreszenz-basierte Methoden (Abbildung 4) ermöglichen spezifische Darstellungen ziliärer Komponenten und haben das Potential, pathologische molekulare Strukturen zu analysieren (siehe "Diagnose der PCD").

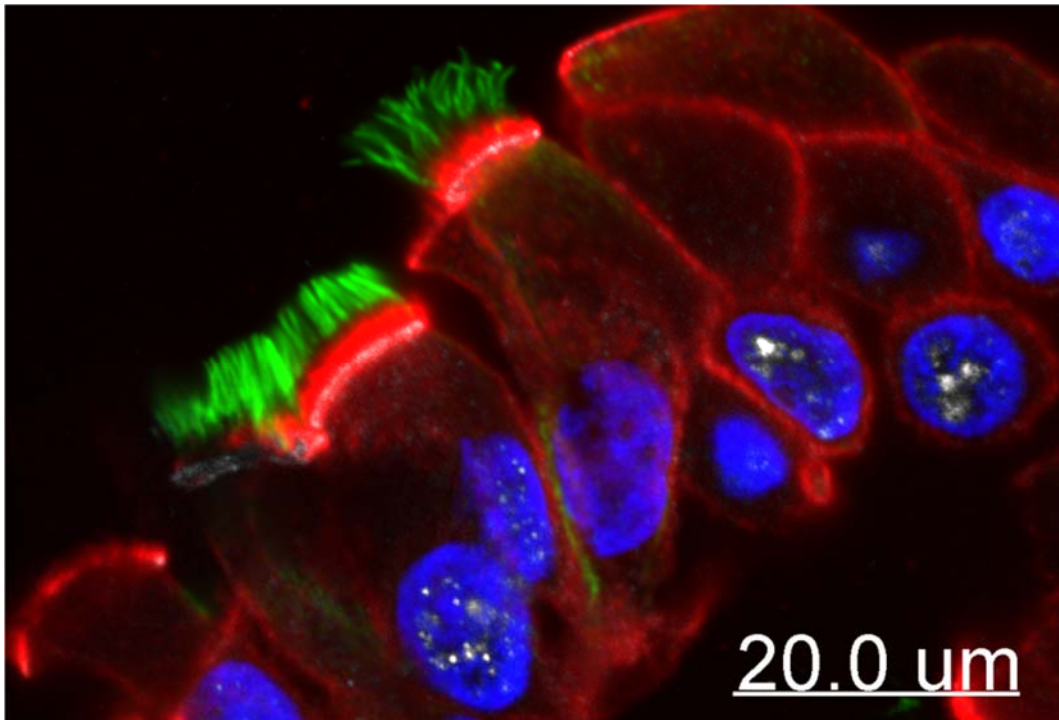


Abbildung 4: Immunfluoreszenzaufnahme menschliches Flimmerepithel.
Zellkultur aus humaner Trachea. Dynein: grün, Zellkern blau (PD Dr. F. Blank, LCI-DKF, Universität Bern).

2.1.2 Zilienfunktion

Die Motilität der Zilien wurde bereits früh mikroskopisch an vitalen Frischpräparaten beobachtet und systematisch beschrieben und mit Transportphänomenen in Verbindung gebracht⁴⁵. Die Bewegung der Zilien besteht aus zwei aktiven Hauptkomponenten, einer etwas langsameren, gebogenen ("recovery stroke") und einer schnelleren, aufrechten in entgegengesetzter Richtung ("power stroke" (Abbildung 5)⁴⁶⁻⁴⁹.

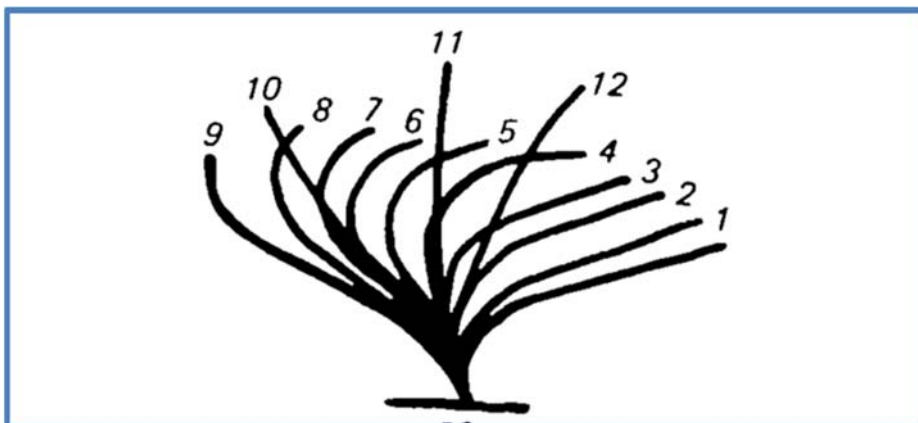


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Zilienschlagzyklus - Seitenansicht. 1-9 recovery stroke, 10-12 power stroke, Schlagfrequenz 14.7Hz, Gesamter Zyklus: 68ms, davon 50ms Bewegungsphasen und 18ms Ruhephase an den Richtungswechseln. Jeder Schritt [1-12] ca. 4ms. Aus Sanderson & Sleight, 1981⁴⁹.

Die Richtung des Zilienschlages ist nur annähernd in einer Ebene, sondern zeigt ein laterales Abweichen (Abbildung 6)^{50,51}. Die Summe der Zilien einer Zelle und von benachbarten Zellen schlägt normalerweise koordiniert längs der Schlagebene, die über weite makroskopische Bereiche ausgerichtet ist⁴². Dies ist auch strukturell an Zilienquerschnitten zu erkennen (Abbildung 1).

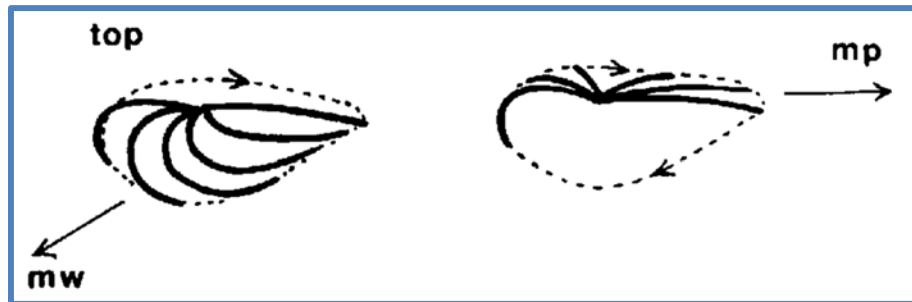


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Zilienschlagzyklus - Aufsicht.
 mp: Richtung der Mukuspropagation, mw: Richtung der metachronalen Welle (antiplektisch). Aus Sleight et al. 1988⁵⁰.

Die zeitliche Koordination entlang der Schlagebene weist eine leichte Latenz auf, was als metachronale Welle bezeichnet wird^{48,52,53}. Vom Aspekt her entspricht sie einem Kornfeld, über welches ein Windstoss zieht. Die Welle ist antidrom gegenüber der Richtung des Mukustransportes und wird als "antiplektisch" bezeichnet⁵⁴.

Die meisten Vorgänge der Zilienmotilität sind noch nicht vollständig geklärt. So sind die Mechanismen des mikrotubulären Gleitens mit Interaktion von Dynein und Tubulin^{55,56}, die Steuerung des einzelnen Zilienschlages^{56,57}, die Koordination der Zilien untereinander^{54,58}, aber auch der Modus der Kraftübertragung von den motilen Zilien auf den Mukus^{59,60} Inhalt aktuellster Forschung.

Es muss immer beachtet werden, dass in der Grössenordnung der Kinozilien (Mikrometerbereich) die relative Viskosität viel höher ausfällt und nicht dem normalen Verständnis eines bewegten Objektes in wässriger Umgebung entspricht^{54,61}. Dieser Kontext der hohen Reynoldszahlen verändert die Phänomenologie der Zilienmotilität und Mukuspropagation enorm. Die Einflüsse der periziliären Umgebung auf jegliche Aspekte der Motilität dürfen nicht ausser Acht gelassen werden und erschweren daher die videomikroskopische Beurteilung in der Diagnostik der PCD.

Die Motilitätsanalyse muss all diese Aspekte berücksichtigen. Erschwerend kommt hinzu, dass Zilienfunktionsstörungen von kompletter Amotilität (wie früh beschrieben) bis zu videomikroskopisch nahezu unauffälligem Schlagverhalten alle Befunde aufweisen können.

Primäre Zilien, die in der Regel unbeweglich sind und denen das zentrale Tubuluspaar fehlt [9 + 0 Muster], wurden an vielen epithelialen und epitheloiden Zelltypen gefunden. Bereits in der frühen Entwicklung werden sie am Primitivknoten gefunden, wo sie mithelfen, die Organtopik des späteren Organismus zu organisieren^{18,19}. In diesem Kontext ist das Auftreten des Situs inversus und anderer Entwicklungsstörungen bei PCD zu sehen. Die primären Zilien werden grundsätzlich mit sensorischen Funktionen in Verbindung gebracht und stehen mit verschiedenen sehr seltenen Syndromen in Verbindung⁶². Unter anderem ist die Flussmessung eine angenommene Funktion: in Nierentubuli (Defekt → Polyzystische Nierenerkrankung)²⁰, an Zellen des Plexus choroideus (Defekt → Hydrocephalus internus)²² und an Endothelzellen^{17,63}. Amotile Zilien werden auch in vielen sensorischen Zellen (Auge, Nase, Ohr) gefunden. Die Ziliopathien primärer Zilien sind nur indirekt mit der PCD verbunden und nicht Thema dieser Arbeit.

2.2 Genetik der PCD

Früh war die familiäre Häufung der Kartagener – Symptomatik thematisiert worden^{64,65} und die Konsanguinität der Zilienproblematik in der Erstbeschreibung des *Immotile Cilia Syndromes* postuliert¹. In den Neunzigerjahren begann die Suche nach den beeinträchtigten Genen^{66,67} und bald wurde klar, dass wohl mehrere Dutzend Gene die komplexe axonemale Struktur der Zilien codieren. Aktuell sind über 30 Gene bekannt, welche für die PCD verantwortlich gemacht werden⁶⁸.

Natürlich ist bei einem erblichen Syndrom wie der PCD die genetische Typisierung die direkteste Analysemethode. Die komplexe Struktur der Zilien erfordert eine breite Palette an Proteinen, respektive Genen, die dafür codieren (sogenanntes *Ciliome*)⁶⁹ und potentiell mutieren können.

Das *Ciliome* soll aus 2500 Genen/Proteinen bestehen⁷⁰⁻⁷², was erahnen lässt, wie heterogen und komplex sich eine PCD Typisierung darstellt. Immerhin wird davon ausgegangen, dass 2/3 der PCD Fälle durch entsprechende Mutationen erklärt werden können. Von den über 30 festgestellten Mutationen bei PCD (Abbildung 7) betrifft die Mehrzahl die Dyneine (Übersichten in^{68,73-75}). Andere Mutationen betreffen das zentrale Paar, die Radial Spokes, die Nexin Links⁷⁶⁻⁷⁹ und den DRC (*Nexin Dynein Regulatory Complex*)⁸⁰.

Gene name	Defect	Reference
<i>ARMC4</i>	ODA	[50]
<i>C21orf59</i>	ODA	[51]
<i>CCDC103</i>	ODA	[52]
<i>CCDC114</i>	ODA	[53]
<i>CCDC151</i>	ODA	[54]
<i>CCDC164 (DRC1)</i>	'Nexin-Dynein Regulatory Complex'	[55]
<i>CCDC39</i>	IDA	[56]
<i>CCDC40</i>	IDA	[57]
<i>CCDC65 (DRC2)</i>	'Nexin-Dynein Regulatory Complex'	[51]
<i>CCNO</i>	'Ciliogenesis'	[58]
<i>DNAAF1 (LRRC50)</i>	ODA + IDA	[59]
<i>DNAAF2 (KTU)</i>	ODA + IDA	[60]
<i>DNAAF3</i>	ODA + IDA	[61]
<i>DNAAF5 (HEATR2)</i>	ODA + IDA	[62]
<i>DNAH1</i>	IDA	[63]
<i>DNAH11</i>	Normal structure	[35]
<i>DNAH5</i>	ODA	[64]
<i>DNAH8</i>	ODA	[65]
<i>DNAI1</i>	ODA	[7]
<i>DNAI2</i>	ODA	[66]
<i>DNAL1</i>	ODA	[67]
<i>DYX1C1 (DNAAF4)</i>	ODA + IDA	[68]
<i>GAS8 (DRC4)</i>	'Nexin-Dynein Regulatory Complex'	[69]
<i>HYDIN</i>	Central apparatus	[70]
<i>LRRC6</i>	ODA + IDA	[71]
<i>MCIDAS</i>	Ciliogenesis	[58]
<i>NME8 (TXNDC3)</i>	ODA	[72]
<i>OFD1</i>	Ciliogenesis	[17]
<i>RPGR</i>	Transitional zone	[16]
<i>RSPH1</i>	Radial spoke head	[73]
<i>RSPH3</i>	Radial spoke head	[74]
<i>RSPH4A</i>	Radial spoke head	[75]
<i>RSPH9</i>	Radial spoke head	[75]
<i>SPAG1</i>	ODA + IDA	[76]
<i>WDR35</i>	Intraciliary transport	[18]
<i>ZMYND10</i>	ODA + IDA	[77]

ARMC, armadillo repeat-containing protein; CCDC, coiled-coil domain-containing protein; CCNO, cyclin O; DNAAF, dynein, axonemal, assembly factor; DNAH, dynein, axonemal, heavy chain; DNAI, dynein, axonemal, intermediate chain; DRC, dynein regulatory complex, subunit; HEATR, heat repeat-containing protein; HYDIN, hydrocephalus-inducing; IDA, inner dynein arm; KTU, kintoun; LRRC, leucine-rich repeat-containing protein; MCIDAS, multiciliate differentiation and DNA synthesis-associated cell cycle protein; NME, nucleoside diphosphate kinase; ODA, outer dynein arm; ORD1, orofacioidigital syndrome 1; RPGR, retinitis pigmentosa GTPase regulator; RSPH1, radial spoke head 1; SPAG1, sperm-associated antigen; TXNDC, thioredoxin domain-containing protein; WDR, β -transducin repeat-containing protein; ZMYND, zinc finger MYND domain-containing protein.

Abbildung 7: Liste identifizierter Genmutationen bei PCD.

Aus Milla, 2016⁷⁵

2.3 Klinik der PCD

Die PCD kann sich oft sehr früh mit einem neonatalen Atemnotsyndrom (*neonatal respiratory distress syndrome*, NRDS) manifestieren^{2,81-85}, was auf eine vorgegebene Funktionsstörung der mukoziliären Reinigungsmechanismen hindeutet. Durch die autosomale Vererbung manifestiert sich das Syndrom geschlechtsunabhängig. Das Fehlen der embryonalen Lateralisierung führt zu einer Zufallsverteilung der Organe, was zu einer durchschnittlichen Manifestation des Situs inversus (totalis oder partialis) von 50% bei PCD Patienten führt. Die strenge Nutzung der Trias-Definition nach Kartagener^{8,9} würde also theoretisch 50% der Patienten unentdeckt lassen.

In jungen Jahren treten zunehmende Zeichen einer chronischen Lungenaffektion auf (Tabelle 1), welche aber recht unspezifisch sind und von Patient zu Patient enorme Unterschiede in der Form, dem zeitlichen Ablauf und der Intensität aufweisen. Im weiteren Verlauf entwickeln sich Langzeitschäden in Gestalt von Bronchiektasen und Lungenatelektasen², die es notwendig machen, von PCD betroffene Patienten einer adäquaten Therapie zukommen zu lassen. Eine kausale Behandlung der PCD ist zurzeit noch nicht möglich. Die unspezifischen, betont luftwegsbezogenen Symptome werden durch gebräuchliche antibiotische und atemtherapeutische Ansätze angegangen, meist mit einem der PCD angepassten Schema⁸⁶. Die korrekte Diagnose ist daher entscheidend um Verlauf und Langzeitprognose der Betroffenen zu verbessern^{6,30,84,87}.

Wichtig ist auch das Wissen um die allfällige Vererbung und die mögliche Infertilität durch Beeinträchtigung der Flimmerfunktion in den Ductuli efferentes, sowie eine Beeinträchtigung der Spermienbeweglichkeit. Die PCD bedingte Motilitätsstörung im Flimmerepithel der Eileitern führt bei Frauen zu einer Subfertilität^{2,88,89} und allenfalls zu ektopen Schwangerschaften^{30,90}. Bedingt durch die dysmotilen Zilien bei PCD scheint die männliche Sterilität eine höhere Penetranz zu besitzen^{91,92}.

Tabelle 1: Manifestationen und Symptome bei PCD

Neonatales Atemnotsyndrom
Chronisch rezidivierende Bronchitiden mit produktivem Husten
Chronisch rezidivierende Pneumonien
Chronische Rhinorrhoe (umgangssprachlich <i>Rotz-</i> oder <i>Schnudernase</i>)
Chronisch rezidivierende Sinusitiden
Chronisch rezidivierende Otitis media mit möglichem zunehmendem Hörverlust Paukenerguss " <i>glue ear</i> "
Bronchiektasen (mittel-langfristig)
Lungenatelektasen (mittel-langfristig)
Atypisches Asthma
Situs inversus totalis / partialis (Dextrokardie)

Abschliessend muss betont werden, dass die Klinik der PCD eine enorme Spanne an Symptomen aufweist, die überwiegend nicht spezifisch pathognomonisch sind. In Verbindung mit einer hohen Heterogenität des zeitlichen Auftretens, des Verlaufes und der Manifestationsstärke ist das Erkennen der PCD als Ursache enorm anspruchsvoll.

2.4 Diagnose der PCD

Keine der aktuell eingesetzten und hier gelisteten diagnostischen Ansätze kann alle Formen der PCD eruieren^{29,93}. Es bedarf einer Sequenz von diagnostischen Schritten um in möglichst vielen Fällen zur Entscheidung zu gelangen⁹⁴. In der Schweiz ist die PCD als erbliche Erkrankung, ein sog. Geburtsgebrechen, anerkannt und in der "Liste der Geburtsgebrechen" innerhalb der "Verordnung über Geburtsgebrechen (GgV)"⁹⁵ aufgelistet. Wie aus dem Eintrag in Abschnitt VI, Ziffer 249, Zitat, "Primäre ciliäre Dyskinesie (sofern die **elektronenmikroskopische** Untersuchung in einem **infektfreien** Intervall durchgeführt wurde)", ersichtlich ist, muss die Diagnose obligat strukturell am TEM erfolgen.

2.4.1 Screening Tests

Als erster Screening Test wird die Konzentrationsmessung der Stickoxide (*nitric oxide* [NO]) in der nasalen Ausatemluft genutzt^{96,97}. Die Bedeutung des NO geht auf Beobachtungen zurück, welche den Stickoxyden einen Einfluss auf die Zilienschlagfrequenz zuordneten²⁶ und empirisch bei PCD, respektive Kartagener-Betroffenen, tiefe Stickoxyd Werte in der Atemluft aufzeigten⁹⁸⁻¹⁰⁰. Die Ursache der tiefen NO Werte bei PCD ist noch nicht endgültig geklärt. Die gängigen Hypothesen gehen von (i) einem erhöhten Abbau der NO durch vermehrten Verbrauch durch oxydativen Stress, Bakterien etc., (ii) von einer verminderten Synthese

(Aktivitätsverminderung der NO-Synthase [NOS]) oder (iii) dem Einfluss der bei PCD obstruierten Paranasalsinus¹⁰¹ aus.

Die Sensitivität der NO Messung ist recht hoch¹⁰², wobei jedoch einzelne falsch negative Befunde auftauchen können⁹⁴. Die Spezifität wird ebenfalls kritisch diskutiert, da suboptimale Messbedingungen und andere pulmonale Erkrankungen ein tiefes nasales NO (nNO) zeigen und so zu unnötigen, kostenintensiven Folgeschritten führen können¹⁰³. Dieser rasch durchführbare Test benötigt eine adäquate Infrastruktur (Zentrumsklinik) und Erfahrungen in der Messung. In der Summe ist die Nutzung des nNO als früher Screeningtest zur Zeit noch kontrovers¹⁰⁴.

Der früher regelmässig genutzte Saccharintest, bei welchem nach Aufbringen von Saccharinpartikeln in der Nase die Latenzzeit gemessen wird, bis eine Süsse im Mund wahrgenommen wird¹⁰⁵, ist vom Prinzip her bestechend, da direkt die Effizienz des mukoziliären Transportes festgestellt wird. Gerade im Kindesalter ist dieser Test allerdings bezüglich Sensitivität und Spezifität ungenügend (u.a. mangelnde Compliance) und wird daher nicht mehr empfohlen³⁰.

2.4.2 Ultrastruktur (TEM)

Bis vor einigen Jahren war die ultrastrukturelle Analyse mittels Transmissions-elektronenmikroskopie [TEM] der klassische Diagnoseweg und wurde als "Gold Standard" in der PCD Diagnostik bezeichnet¹⁰⁶⁻¹⁰⁹. Die ultrastrukturelle Bildgebung basierte auf einer langjährigen technischen Entwicklung in der TEM. Basierend auf der stark organisierten Struktur des Axonems im Querschnitt (siehe "Zilienstruktur") sind einige "Referenzzeichen" der PCD als pathognomonisch anerkannt.

Zu diesen Zeichen gehören die äusseren [ODA] und inneren Dyneinarmdefekte [IDA] (Abbildung 8), die Transpositionen und die *Radial Spokes* Defekte¹¹⁰. Das Fehlen der ODA an mehr als 2 peripheren Doppeltubuli ist bereits aussagekräftig^{1,107,111-113}. Das Fehlen der IDA ist weniger klar beschrieben. Breits unter normalen Bedingungen sind IDA in zufälligen Zilienquerschnitten weniger gut abgebildet, bedingt durch deren axial geringeren Dichte gegenüber den ODA (ODA: 24nm Periodizität im Längsschnitt, IDA 96nm Periodizität)¹¹⁴. In Standard 60nm Ultradünnschnitten sind IDA nicht in jedem Schnitt repräsentiert. Bereits 2-3 IDA pro Axonem gelten als normal. Ein IDA Defekt ist also nur auszusprechen, wenn diese komplett fehlen. Selten wurde der IDA Defekt als isolierter Befund beschrieben⁵. Meistens wird er in Kombination mit ODA oder *Radial Spokes* Defekten genannt^{30,107,113,115-117} und nicht als isoliertes Zeichen akzeptiert^{68,111}.

Die sogenannten Transpositionen (Abbildung 9) sind seit langem als klassisches Zeichen der PCD akzeptiert¹¹⁸. Dabei fehlt das zentrale Tubuluspaar ([CP] *central pair*) und ein peripheres

Paar rutscht in die Mitte. Peripher sind dadurch nur noch 8 Paare zählbar. Meist sind dabei die *Radial Spokes* nicht abzubilden (Abbildung 9), was in Einklang mit dem Fehlen ihrer ordnenden Funktion steht.

Weitere tubuläre Desorganisationen, auch bei Vollzähligkeit der Tubuluspaare, sind durch die *Radial Spokes* bedingt, meist mit exzentrischen CP und/oder dislozierten peripheren Paaren¹¹⁹. Vor einigen Jahren wurde auch das isolierte Fehlen des zentralen Paares ohne Dislokation eines peripheren (CP Defekt) als Zeichen der PCD postuliert¹²⁰. Während in der Originalpublikation das Zentrum komplett leer erschien, sind in Folgepublikationen oft Schatten elektronendichten Materials zu erkennen^{76,115,121,122}. CP Defekte sind meist mit *Radial Spokes* Defekten verbunden⁷⁸.

Schwierigkeiten für die strukturelle und funktionelle Diagnostik bieten seltene Varianten der PCD, die als Zilienaplasien klassiert werden¹²³⁻¹²⁵. Unter Umständen sind dort einzig quantitative Parameter aussagekräftig.

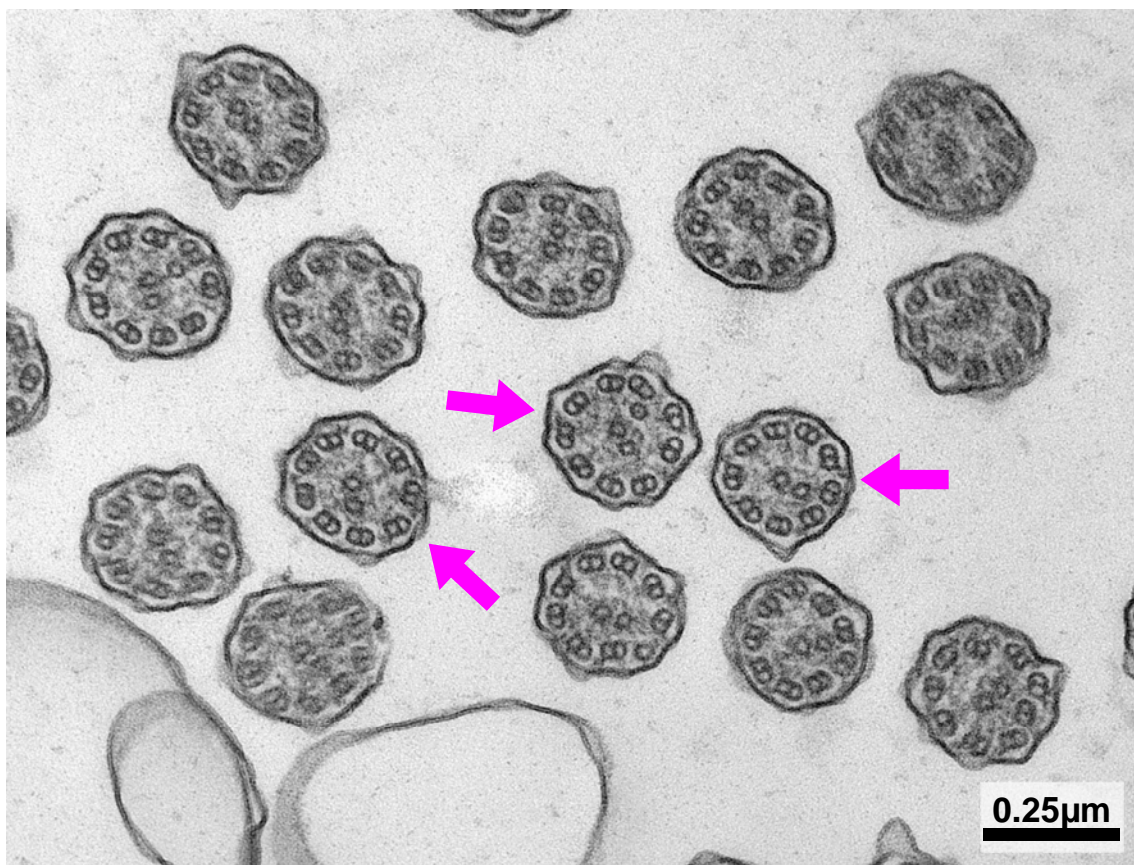


Abbildung 8: ODA und IDA Defekte

Pfeile: beide Defekte sichtbar, Befund ist nicht durchgehend

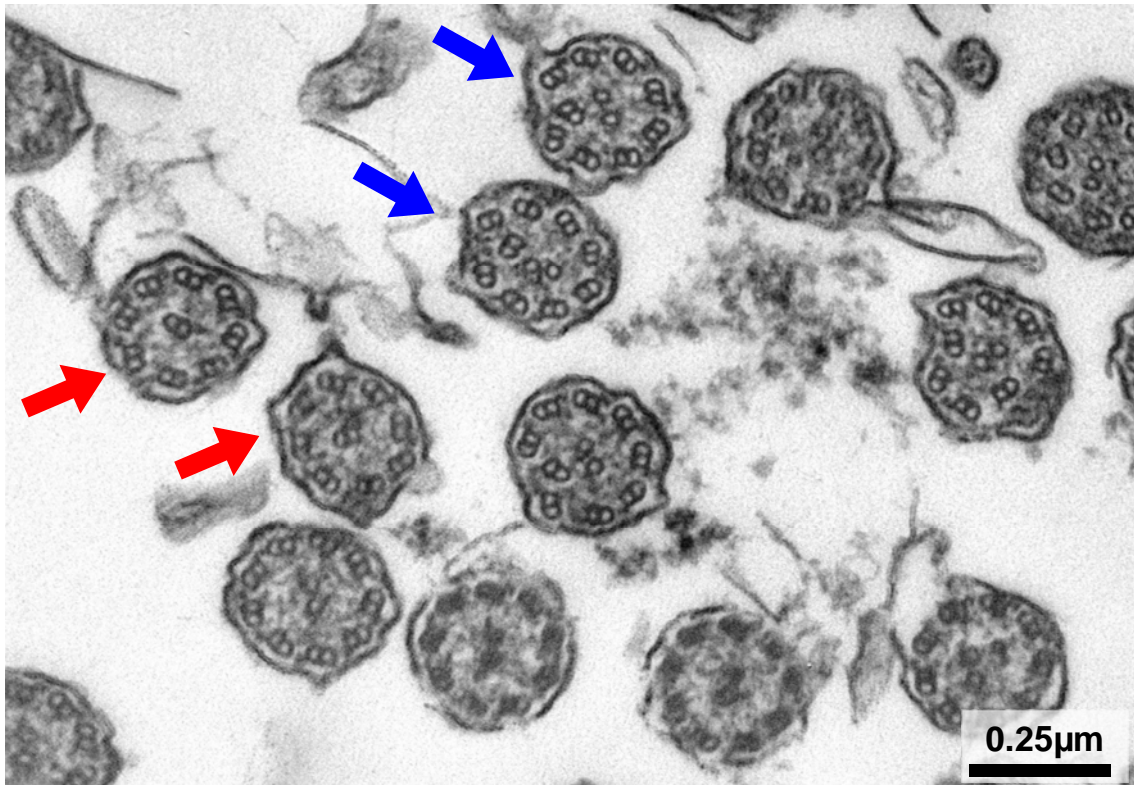


Abbildung 9: Transpositionen

TEM Bild eines PCD Patienten, rote Pfeile: Transpositionen, blaue Pfeile: Massive tubuläre Desorganisation als Hinweis für Radial Spokes Defekt

2.4.3 Videoanalyse (HSVA)

Verschiedene aktuellere Studien zeigten auf, dass PCD Fälle ohne erkennbare ultrastrukturelle Zeichen existieren^{74,111,121}. Es entstand eine Unsicherheit bezüglich der Sensitivität der TEM mit der Möglichkeit fälschlich als gesund (falsch negativ) deklarerter Patienten. In diesem Dilemma entwickelte sich die Hochgeschwindigkeits-Video Mikroskopie (*high speed video microscopy analysis* [HSVA]) zu einer aussagekräftigen Methode⁹⁴, umso mehr als die technische Verfügbarkeit von schnellen Aufnahmesystemen zu akzeptablen Preisen eine detaillierte Analyse der Motilität erlaubten.

Neben der Schlagfrequenz (*ciliary beat frequency* [CBF]) konnte nun auch das Schlagmuster (*ciliary beat pattern* [CBP]) und die Koordination der Zilien untereinander begutachtet werden. Die CBF eignet sich nur bedingt als alleiniges Kriterium zur Erkennung der PCD. Normale Vergleichswerte sind nicht standardisiert und werden mit 7 – 20Hz angegeben¹²⁶⁻¹²⁸. Zudem ist der Einfluss der Umgebungsbedingungen (Temperatur, Viskosität, floride Infektionen etc.) gross. Bezüglich CBP klassierten Chilvers et al. die Störungen grob in drei Formen: I) Fast komplette Akinesie mit nur leichtem Zittern der Zilien, II) Steifes Vibrieren der Zilien ohne Differenz zwischen *Power*- und *Recovery-Stroke*, III) Zirkuläres Rotieren der Zilien, einer Kegelform entsprechend¹²⁹. Neuere Publikationen versuchen die genetisch klassierten

Defekte mit gewissen Formen der Motilitätsstörung in Einklang zu bringen⁷³. Auch wenn die Beurteilung der Motilität schwierig ist (siehe "Zilienfunktion") sind die Bewegungsphänomene viel direkter mit einer allfällig verminderten Transporteffizienz verbunden und werden manchmal als neuer "Gold Standard für PCD Diagnostik" bezeichnet.

2.4.4 Genetische Analytik

Aktuell sind grosse Bestrebungen im Gange, die Palette der identifizierten Genmutationen zu erweitern. Immerhin erlauben die über 30 bekannten Mutationen eine Diagnose von ca. 2/3 der PCD Manifestationen^{75,130}.

Da von mehreren Hundert bis zu Tausenden Genen ausgegangen wird, die sich für das *Ciliome* verantwortlich zeigen⁷⁰⁻⁷², ist der Aufwand sehr gross, jedoch, dank der rasanten Entwicklung im *Whole Exome / Genome Sequencing*^{68,131-133} im Bereich des Möglichen. Erschwerend kommt jedoch hinzu, dass noch keine einfachen und kostengünstigen Chips oder Panels zur breiten Analytik verfügbar sind und die Genanalyse auf wenige Zentren beschränkt ist. Die Situation wird sich aber in naher Zukunft sicher verbessern, wenn *Next Generation Sequencing* [NGS] diese Aufgabe erleichtert. Ob und wann alle verantwortlichen Sequenzen der PCD identifiziert werden, ist noch nicht abzusehen. Der Teil der genetisch nicht zugeordneten und daher nicht detektierten Störungen wird weiter auf die strukturell-funktionelle Analytik angewiesen sein und besonders im Bereich des Screenings. In dieser Arbeit soll nicht weiter auf die genetischen Aspekte der PCD eingegangen werden.

2.4.5 Immunfluoreszenz

Spezifische Markierungen von mutierten Bestandteilen des Axonems, speziell der Dyneine^{134,135} und der *Radial Spokes* Defekte¹³⁶, sind bekannt. Die besteckende Technologie ist jedoch nur für einzelne Defekte bekannt und nicht breit verfügbar. In Kombination mit anderen Methoden und mit einer zukünftig breiteren Analysepalette hat sie aber ein grosses Potential.

3 Methoden

3.1 Datenerhebung für diese Studie

Die strukturellen und videomikroskopischen Daten dieser Arbeit stammen aus der diagnostischen Tätigkeit zur PCD, welche am Institut für Anatomie, Universität Bern, seit 1981 angeboten wird (gegründet durch Prof. em. Dr. Peter H. Burri). Die in einer Datenbank gespeicherten Angaben wurden anonymisiert zur Verfügung gestellt, neu geordnet und einer Validierung unterzogen, um unvollständige, duplizierte oder irreguläre Einträge zu erfassen, allenfalls zu ergänzen oder zu löschen. Von ursprünglich 257 Datensätzen von 228 Patienten waren 32 Datensätze von 31 Patienten nicht nachverfolgbar. Die 225 Datensätze mit auswertbaren Angaben führten bei 199 Patienten zu einem gültigen Resultat, das als diagnostisches Ergebnis der Ärzteschaft zum Zeitpunkt der Biopsien kommuniziert wurde.

Die bereinigten Daten der gesamten analysierten Kohorte (PCD und nicht-PCD) waren Grundlage der statistischen Betrachtungen und Interpretation der diagnostischen Gegebenheiten und Resultate. Im Zeitraum dieser Rückschau (35 Jahre) haben sich die technischen Möglichkeiten besonders in der Motilitätsanalyse (Video) drastisch verbessert. Durchgängige Vergleiche der Videoanalyse sind daher nicht möglich.

Neben den strukturellen TEM und funktionellen HSVA Befunden, wurden anamnestische Angaben verwertet, welche von den Anmeldeformularen zur Diagnostik stammten. Dies waren Alter, Geschlecht sowie wenige klinische Angaben und Symptombeschreibungen (1-2 Zeilen) die den Verdacht auf PCD deklarierten.

Von den im Zeitraum 1981 bis 2010 diagnostizierten PCD Betroffenen (ultrastrukturell im TEM bestätigt) wurden über informiertes Einverständnis weitere klinisch-anamnestische Angaben aus Krankengeschichten gesammelt. Nach initialer telefonischer Kontaktaufnahme der Betroffenen, erfolgte die schriftliche Anfrage zwecks Einholung des Einverständnisses. Es wurden die Kontaktdaten der behandelnden Ärzte und betreuenden Kliniken erfragt. Zum Zeitpunkt der Anfragen war dieses Vorgehen im Einklang mit den gültigen ethischen Regeln für retrospektive nicht-interventionelle und anonymisierte Analysen, die nur die temporäre Befreiung von der ärztlichen Schweigepflicht betraf. Nach Kontaktaufnahme mit den behandelnden Ärzten wurden die anonymisierten Krankenakten gesammelt. Anschliessend wurden die Daten aufbereitet und Angaben zu einer summarischen Reihe relevanter Stichworte erfasst. Die Stichwortliste wurde in Zusammenarbeit mit Kollegen der Kinderpneumologie des Inselspitals erstellt (Tabelle 2). Einige der Stichworte ergaben retrospektiv keine relevanten Schlussfolgerungen und Gesetzmässigkeiten waren aufgrund der zu kleinen Fallzahlen oft nicht aussagekräftig. Die klinisch-anamnestische Auswertung wird daher in dieser Arbeit nur cursorisch verwendet.

Tabelle 2: Checkliste anamnestische Daten

Erkrankungen
PCD, Kartagener Syndrom, Situs inversus, Bronchiektasie, Otitis Media, Mukotympanon, Sinusitis, Pneumonie, Bronchitis, neonatales Atemnotsyndrom, Dysmorphiesyndrome, Tuberkulose, Extrauterin gravidität (ektepe Schwangerschaft)
Untersuchungen
Spirometrie, arterielle Blutgasanalyse, NO Messung
Mikrobiologie
Haemophilus influenzae, Pseudomonas aeruginosa, Moraxella catarrhalis, Streptococcus pneumoniae, Staphylococcus aureus, Candida albicans, Mycobakterien
Familiäre Assoziation
Situs inversus, PCD
Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde
Paukenröhrchen, Schalleitungsstörung

3.2 Strukturell-funktionelle PCD Diagnostik in Bern

Im seit 1981 angebotenen Diagnoseservice werden Patientensamples von Kindern und selten auch Erwachsenen zugesandt, die wegen rekurrierenden, unklaren respiratorischen Problemen unter dringendem Verdacht für eine PCD stehen (siehe: "Klinik der PCD").

3.2.1 Vitalanalyse (HSVA)

Bis 2004 wurden lediglich klassische Videoaufnahmen (24fps) der Zilienmotilität erstellt und dienten lediglich als grobes Screening, bevor fast alle Proben der TEM zugeführt wurden. Nach Einführung der HSVA 2004 stieg in Bern die Bedeutung und Sensitivität der Vitaluntersuchung und wurde zum effizienten Triagetool, bevor die massiv aufwendigere TEM eingesetzt wurde.

Heute wird in den meisten Fällen respiratorisches Flimmerepithel der unteren Conchae nasales mittels nasalem Brushing entnommen. Die Brushes sind Interdentalbürstchen "fein", "IDB-G 3mm" (Top Caredent, Zürich, Schweiz) (Abbildung 10), welche mit einer Pipettenspitze als Griff und einer zweiten als "Gewebeentferner" versehen sind (Eigenentwicklung). Die Öffnung der zweiten Spitze ist soweit vergrössert, dass sie knapp über den Bürstendraht bewegt werden kann, jedoch beim Streichen über den Bereich der Borsten entnommenes Zellgewebe entfernt, um es der Analyse zuzuführen.



Abbildung 10: *Brushes zur nasalen Entnahme von Flimmerepithel*
Rechte Spitze: angeklebter "Griff", linke Spitze: beweglicher Gewebeentferner

In einigen Fällen wurde das Brushing bronchial durchgeführt, wenn eine Bronchoskopie für andere Interventionen geplant war. Bis vor einigen Jahren wurden Proben fast nur endoskopisch mit kleinsten Biopsiezangen entnommen. Dieses Verfahren, welches eine höhere Belastung für die Patienten und höheren interventionellen Aufwand bedeutet, wird nur noch selten durchgeführt, obwohl es sehr gute Resultate liefert. Die ganzen Brushes werden in 6ml Falcon Röhrchen mit einem Nährmedium (CRML 1066, Gibco, Lubio Science, Luzern, Schweiz) übertragen und idealerweise innerhalb von 30 Minuten ins Institut für Anatomie gebracht. Vor dem Öffnen werden die Röhrchen intensiv geschüttelt, um das Zellmaterial von den Brushes ins Medium zu transferieren. Das Nährmedium wird sodann in eine Petri Schale geleert. An den Borsten verbliebenes Zellmaterial wird mittels "Gewebeentferner" (siehe oben) ebenfalls in die Schale übertragen. Einzelne kleine Gewebestückchen und -flocken werden in einem Tropfen Nährmedium mit einer Pipette auf einen Objektträger gebracht und mit einem Deckglas zugedeckt.

Auf einem Olympus Vanox aufrechten Lichtmikroskop (Olympus AG, Volketswil, Schweiz) werden mit Differenz-Interferenzkontrast (DIC, Nomarski) die ungefärbten Proben begutachtet. Eine chemische Färbung würde die Vitalfunktion unter Umständen hemmen oder verhindern. Die Proben werden auf einem temperaturkontrollierten Mikroskoptisch bei konstant 30°C gehalten. Nach Suche mit kleineren Vergrößerungen (10x – 20x Objektive) wird die Vitalbeurteilung und Videoaufnahme mit einem 40x Objektiv (Endvergrößerung 400x) durchgeführt.

Interferometrische Techniken zur Kontrastgewinnung (DIC, Dunkelfeld, Phasenkontrast) benötigen sehr dünne Proben, um trotz fehlender Färbung eine gute Beurteilung des mikroskopischen Bildes zu erlauben. Ohne Deckglas sind keine befriedigenden Abbildungen möglich. Die Messung des Flüssigkeitsfilms ergab eine Dicke von 25 – 30µm, was den Zilienschlag der maximal 7µm langen Zilien an vielen Stellen nicht tangiert. Eine leichte

Immobilisation der Gewebestückchen und Zellen durch das Deckglas ist sogar förderlich, da sonst das Gewebe durch die Kraft der Zilien oft sofort aus dem Gesichtsfeld verschwindet.

Bildserien werden mit einer Hochgeschwindigkeits CMOS-Monokamera (Flea FL3-U3-13Y3M-C, Point Grey Research GmbH, Ludwigsburg, Germany) mit 300 Bilder pro Sekunde (*frames per second: fps*) als Einzelbildserien während jeweils 2 Sekunden aufgenommen (600 Bilder pro Aufnahme). Die Bilddaten werden direkt über USB 3 an einen Standard-PC (Microsoft® Windows 7®, 64bit, 16GByte RAM, SSD Disk) übertragen, auf welchem die PointGrey Kamerainterface-Software die Kamerasteuerung und Bildformatierung (TIFF, 8bit, 640x480 Pixel, 300fps) erlaubt. Pro Analyse werden durchschnittlich 5 Deckgläser verwendet und pro Deckglas 6 Aufnahmeserien (ca. 15GByte) durchgeführt.

Die Charakterisierung des Zilienschlages (CBP) wird mittels eines in ImageJ¹³⁷ programmierten Tools ermöglicht, welches einfach die Bildserien in Zeitlupe bis zur Einzelbildanalyse ermöglicht und auch Prozesse zur Bildverbesserung (Kontrast, Kantendetektion) zur Verfügung stellt. Die Bewegungsmusteranalyse wird über die ganze Feldgröße an Stellen mit sichtbaren Zilien erhoben. Die Frequenzanalyse wird mittels Fourier Spektralanalyse durchgeführt, wie in Ryser et al. 2007⁶⁰ vorgestellt. Die Zerlegung und Spektrendarstellung wird in einem Tool basieren auf IDL (*Interactive Data Language*, Excelis / Harris Corporation, Melbourne FL, USA) ausgeführt.

Pro Video wird in mehreren Subregionen mit sichtbaren Zilien die Frequenzanalyse durchgeführt. Die Frequenzwerte werden pro Bild und dann pro Patient gemittelt. Keine Analyse wird in Regionen durchgeführt, in denen eine deutliche äussere Beeinträchtigung besteht (Zeichen mukösen Schleims, durch Zellkonglomerate und Zelltrümmer behinderte Zilien, Zilien von zerstörten Zellen, verklebte Zilien). Auf diese Gewichtung wird in der Diskussion näher eingegangen. Die Motilität wird semiquantitativ gescorert. Als normal werden folgende Befunde festgelegt, die in Kombination von mindestens 3 Anteilen auftreten müssen:

- A) Schlagfrequenzen im Bereich von 8-16Hz
- B) Gut diskriminierbarer *Recovery*- und *Power Stroke* bezüglich
 - 1) Form (deutlich gekrümmt im *Recovery* und deutlich gestreckt im *Power Stroke*)
 - 2) Zeitverlauf (deutlich kürzerer *Power Stroke*)
- C) Partikeltransport
- D) Koordination der Zilien
 - 1) Einer Zelle
 - 2) Einer Zellgruppe (interzellulär)

In Anlehnung an Chilvers et al. 2003¹²⁹ werden folgende Muster als **auffällig** erkannt:

- a) Amotilität mit allenfalls minimstem Zittern der Zilienspitzen
- b) Vibrieren der ganzen Zilien mit kleiner Amplitude, teils hochfrequent über 20Hz
- c) Steifes Schlagen der Zilien, etwas grössere Amplitude, *Recovery-* und *Power stroke* nicht unterscheidbar, normal- bis tieffrequent
- d) Rotieren der Zilien

Bei Auswertungen, die vital eine oder mehrere dieser Befunde zeigen oder deren Befunde nicht genügende Normalcharakteristika aufweisen, wird eine TEM Analyse durchgeführt.

3.2.2 Ultrastrukturanalyse (TEM)

Bei jedem Nasalbrushing wird zusätzlich eine benutzte Bürste direkt in Fixativ (2.5% Glutaraldehyd, 350mOsm, gepuffert auf pH7.4 mit HEPES) überführt. Die Fixationsqualität ist besser als von vorher für die Vitalanalyse benutztem Zellmaterial. Dennoch wird auch das Material nach Begutachtung im LM in ein zusätzliches Fixativröhrchen eingebracht. Die Gewebestückchen werden mit Osmium nachfixiert und nach Dehydratation in Epon eingebettet. 2 * 2 mm messende Ultradünnschnitte (60nm) werden an einem Leica Ultracut UC6 Ultramikrotom (Leica Microsystems, Wien, Österreich) geschnitten und auf 200 Loch Kupfernnetzchen transferiert. Der Kontrast wird mit Uranylacetat und Bleizitrat an einem Leica Ultrastainer (Leica Microsystems, Wien, Österreich) erhöht.

Die Netzchen werden an einem Philips CM 12 oder Tecnai Spirit TEM betrachtet und Bilder bei ca. 50'000-facher Vergrößerung geschossen. Pro Patient werden zwischen 40 und 80 Bilder aufgenommen, welche in der Summe idealerweise mindestens 100 streng orthogonal abgebildete beurteilbare Querschnitte enthalten. Situationsabhängig muss die Analyse auch mit weniger Querschnitten durchgeführt werden. Zur Analyse der Ausrichtung werden auch kleine Vergrößerungen im Zellapexbereich aufgenommen um Wurzelfüsschen darzustellen.

An den Querschnitten werden die für PCD charakteristischen Zeichen erfasst ((siehe "Ultrastruktur (TEM)": Dyneinarme, Radial Spokes, Transpositionen, Tubulusdefekte und -desorganisationen, Zentralpaardefekte), aber auch sog. Compoundzilien (Verschmelzen von Zilien als Zeichen florider Entzündungen bei sekundären Dyskinesien)¹³⁸).

Auch die Orientierungen der Zilien und ganz allgemein der Fixationsgrad werden festgestellt. Die Befunde werden semi-quantitativ erfasst.

4 Resultate

Die Tabelle 3 listet die Patientenkohorte in der Zeitperiode 1981 bis 2015 auf, welche bei 199 Patienten zu einer konklusiven Aussage führte. Es wird das diagnostische Vorgehen zusammengefasst. Die Zahl der Analyseanträge ist in den letzten 35 Jahren stetig gewachsen und erreichte im 2015 18 Anfragen (siehe Abbildung 11). Weiter sind die klaren Trends zu mehr Nasalbiopsien versus Bronchialbiopsien (Abbildung 12) und mehr Vitalanalysen versus TEM Untersuchungen (Abbildung 13) dargestellt. Klar ersichtlich ist auch die fast identische Geschlechtsverteilung bereits der Verdachtsfälle sowie der PCD-Diagnostizierten. Der Zeitpunkt der Analyse war im Median bei 8.2 Jahren (Mittel: 15 Jahre). In Abbildung 14 wird klar der Trend zur früheren Diagnosestellung ersichtlich. Bei 16 Patienten (8%) musste die funktionelle und/oder strukturelle Diagnostik wiederholt werden und bei 6 brauchte es einen 3. Versuch (3%).

Tabelle 3: Übersicht der Analysetätigkeit 1981-2015

Patientenübersicht		
Patienten mit konklusiver Analytik	199	
weiblich	102	(51.3%)
männlich	97	(48.7%)
Alter zum Zeitpunkt der strukturellen Analyse:	Median: 8.2J, Mittel: 15J	
Patienten ohne funktionell-strukturelle Zeichen der PCD	161	
PCD Diagnose aufgrund struktureller Zeichen	38	
weiblich	20	(52.6%)
männlich	18	(47.4%)
Biopsie Lokalisation ⁽¹⁾		
Bronchialbiopsie, meist Zange (<i>bis 2010: 80%</i>)	133	(61.3%)
Nasalbiopsie, nur Brush (<i>seit 2010: 80%</i>)	81	(37.3%)
Sperma	3	(1.4%)
Diagnostische Methode(n)		
Video Analyse (HSVA) ⁽²⁾	162	
Video normal [mit Transport: 41, 34% der normalen]	123	(75.9%)
Video anormal	25	(15.4%)
Video inkonklusiv	17	(10.5%)
TEM Analyse ⁽²⁾	149	
TEM normal oder unspezifisch / sekundäre Zeichen	108	(72.5%)
TEM PCD	38	(25.5%)
TEM inkonklusiv ⁽²⁾	3	(2.0%)

(1) Einige Patienten hatten mehrfache Biopsien von 2 bis 3 Orten. Die Summe der "Lokalisationen" ist daher höher als die Gesamtzahl der konklusiven Resultate.

(2) Nicht alle Biopsien wurden mit HSVA und TEM analysiert. Die Gesamtzahl konklusiver Resultate je Technik ist daher kleiner als die Gesamtzahl konklusiver Resultate.

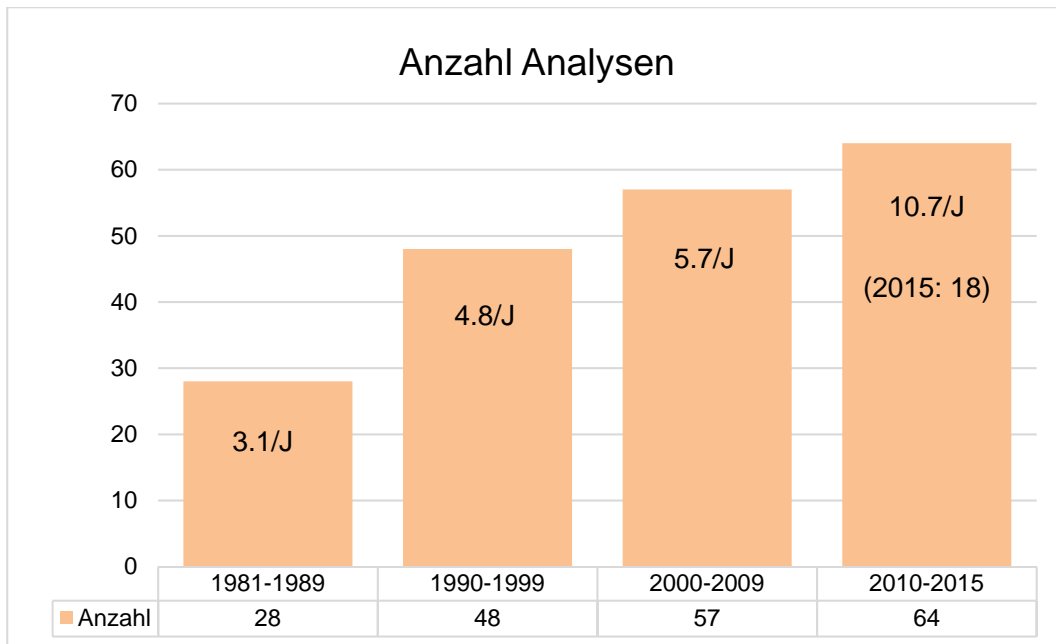


Abbildung 11: Anzahl Analysen
Gesamtkohorte

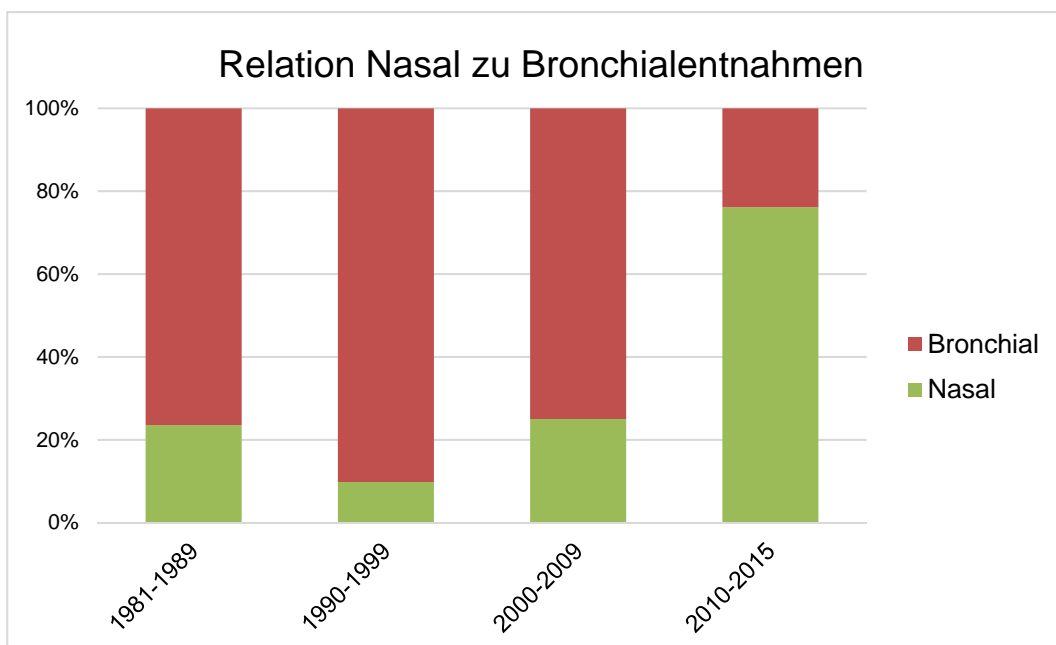


Abbildung 12: Relation nasale zu bronchialer Probeentnahme
Gesamtkohorte

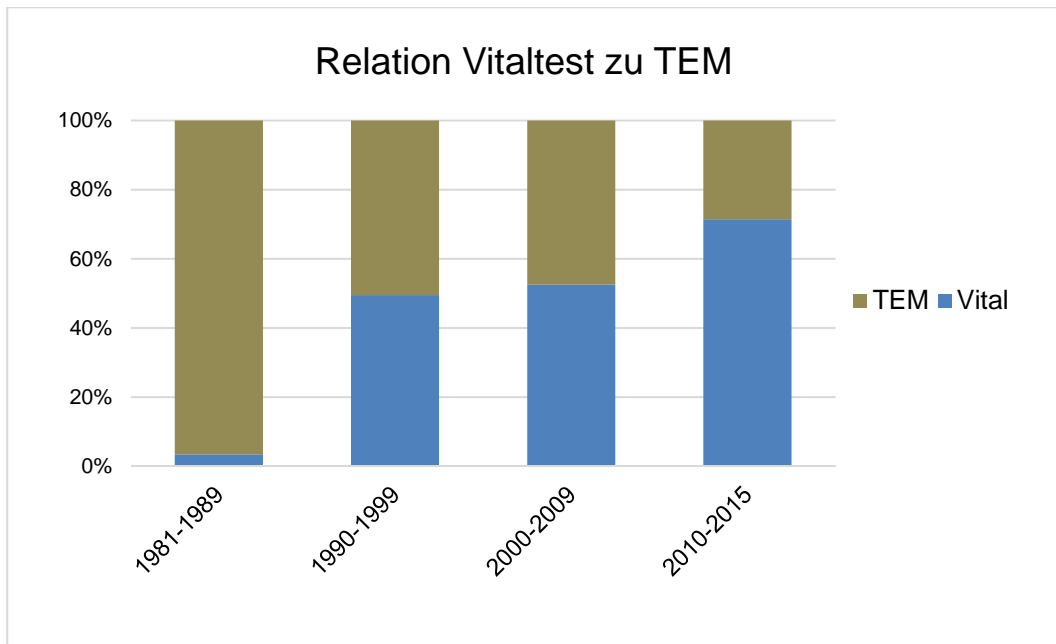


Abbildung 13: Relation Vital zu TEM Analyse, Gesamtkohorte

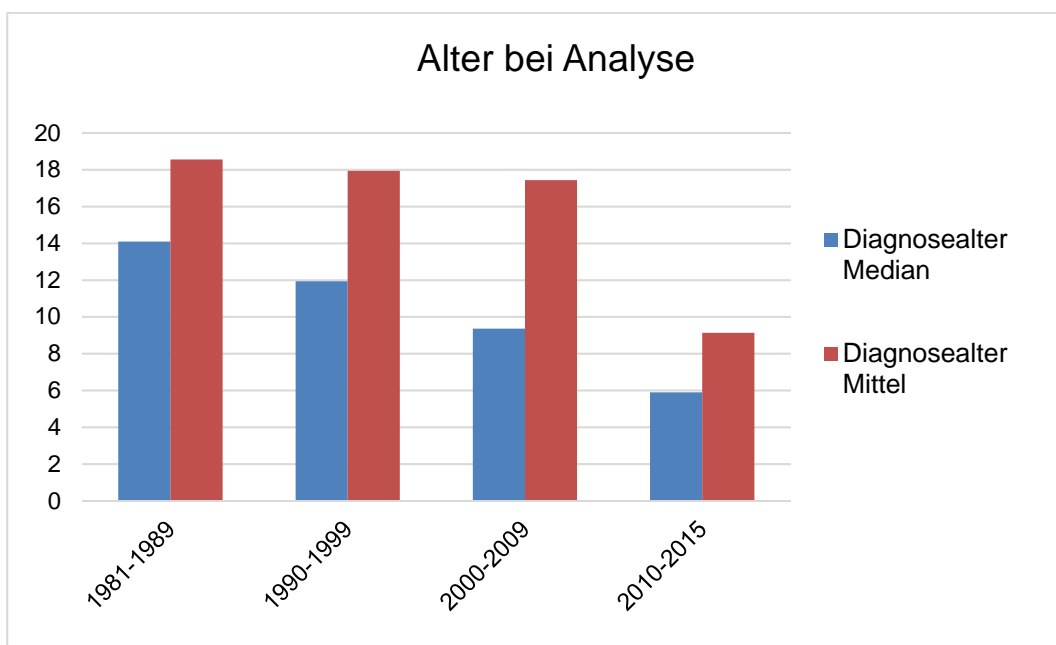


Abbildung 14: Analysealter Gesamtkohorte

4.1 Strukturelle und funktionelle Befunde Gesamtkohorte

Die diagnostischen Prozedere in der PCD Analytik im Institut für Anatomie wurden in den vergangenen Jahren immer mehr verfeinert, im Besonderen die HSVA. Mangels detaillierter technisch-präparatorischer Beschreibungen in der Literatur, konnten jedoch kaum Vergleiche oder Validierungen durchgeführt werden. Es wurde daher hier angestrebt, mittels zusammenfassender Betrachtung der analytischen Resultate, eine eigene Validierung anzustreben und einige Postulate, die in Bern angewandt werden, zu überprüfen.

Auch wenn in der HSVA in 2/3 der Analysen eine PCD bereits vital ausgeschlossen werden konnte und dadurch die viel aufwendigere TEM seit einigen Jahren viel weniger beansprucht werden muss, so besteht doch ein relevantes, v.a. präparatorisch-technisches Verbesserungspotential.

In der gesamten Zahl der Analysen aus nasalen Brushings zeigten 1/3 Zeichen einer viskösen Verschleimung, was teils bereits am Bürstchen, während des Transfers des Zellmaterials aus dem Medium in die Petrischale, auf den Objektträger oder unter dem Mikroskop sichtbar war. In diesen Fällen war dann oft eine zusätzliche bakterielle Kontamination feststellbar (subzellulär grosse Partikel, die teils leicht beweglich waren). 50% der auffällig verschleimten Proben zeigten dennoch im Mittel normale Schlagmuster und -frequenzen, wobei die Heterogenität der Befunde grösser war, als in weniger verschleimten Proben. Zusätzlich waren in den verschleimten Proben weniger Transportphänomene zu beobachten (nur in 1/3 bei sonst normaler HSVA Befundung). In Proben ohne Zeichen übermässiger Verschleimung war Partikeltransport in 2/3 vorhanden. Dies führte dazu, dass, aufgrund von unklaren HSVA Befunden, mehr verschleimte Proben ultrastrukturell nachuntersucht wurden (50% gegenüber 30% bei nicht verschleimten Proben). Kursorisch war auch die Qualität der TEM Bildgebung bei lichtmikroskopisch verschleimten Proben schwieriger zu beurteilen, bedingt durch schlechteren strukturellen Erhalt (rupturierte Zellmembranen, ödematöse Zilien, deutlich schlechtere Kontrastgebung). Von den zweifelhaften HSVA Befunden mit Verschleimungszeichen war ein einziger im TEM als PCD identifiziert worden.

Die Analysen von Bronchialbiopsien (meist mit Brush, einige mit Forceps) zeigten durchgehen eine eindeutigere und einfachere Befundung im HSVA, bedingt durch deutlich geringere Verschleimungstendenz (nur in 12%, nasal 35%). Auch der Erhaltungszustand des Gewebes und dadurch die Beurteilbarkeit in der TEM war hier besser.

4.1.1 Zeiteinflüsse

Die Latenz zwischen Zellentnahme und Vitalbegutachtung kann das Resultat beeinflussen. Um die Richtlinie von maximal 30 Minuten zu verifizieren, wurden Zeitserien von Videoaufnahmen normaler Biopsien ohne Zeichen einer PCD aufgenommen und nachfolgend Schlagfrequenzmessung durchgeführt (Abbildung 15).

Die Frequenzen, aber auch das Schlagmuster (Daten hier nicht gezeigt) blieben bei adäquater Feuchthaltung über Stunden konstant. Die grösste Beeinflussung entstand durch die Austrocknung der Probe zwischen Objektträger und Deckglas.

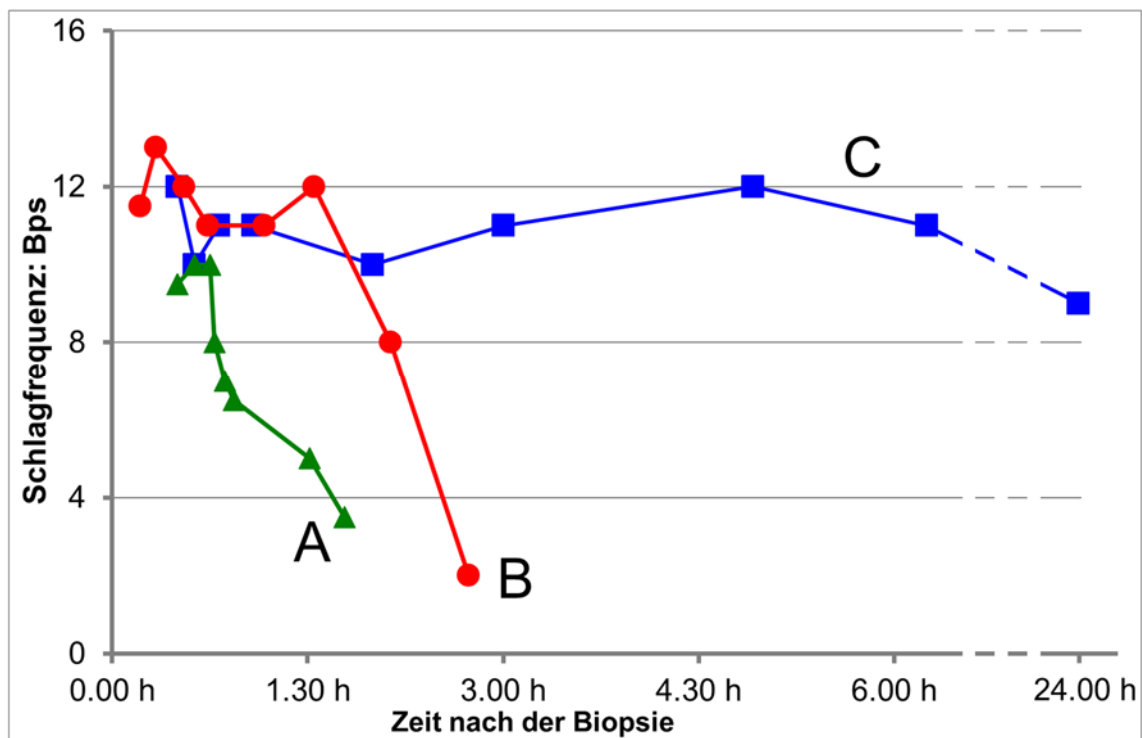


Abbildung 15: CBF Zeitserien

A, grüne Linie: normale humane Probe mit einer initialen mittleren CBF von 10Hz. Objektträger auf konstant 30°C temperiert, keine Befeuchtung. Frequenz verringert sich kurz nach initialer Begutachtung, Probe trocknet aus. B, rote Linie: normale Probe mit 12Hz Initialfrequenz. Objektträger wird konstant feucht gehalten, 30°C: Frequenz bleibt 2 Stunden normal. C, blaue Linie: normale Probe mit 12Hz Initialfrequenz. Jeder Messpunkt entstammt einem neuen Gewebestückchen welches vom Brush entnommen wird, aufbewahrt im Nährmedium bei 25°C (Analysetemperatur 30°C). Erst nach mehr als 7 Stunden Verminderung der CBF, nach 24h immer noch > 8Hz. Mittel von 20 – 30 Messungen.

4.1.2 Temperatur

Temperaturserien von normalen Epithelproben ergaben im Bereich von 25 – 35°C keine relevanten Änderungen der CBF (kursorisch).

4.2 Strukturelle und funktionelle Befunde bei PCD Betroffenen

Im Zeitraum 1981 – 2015 wurden im Institut für Anatomie der Universität Bern 38 Diagnosen der PCD gestellt (Krankenakterfassung nur bis 2010). In der Schweiz ist aktuell die PCD Diagnosestellung obligat auf die TEM Bestätigung angewiesen (siehe "Diagnose der PCD"). Es besteht daher eine Verzerrung der strukturellen Befundung in Richtung TEM. Die Diagnosestellung ist sowohl an Bronchialbiopsien als auch an Nasalbrushings möglich. Erstaunlich ist die Beobachtung von 9 "normalen" Vitalbefunden bei ultrastruktureller PCD. Diese Befunde stammen alle aus der Zeit vor Etablierung der HSVA 2004. Der häufigste ultrastrukturelle Befund waren ODA-Defekte, gefolgt von IDA-Defekten. Die meisten der Befunde traten in Kombinationen auf. In geringer Zahl traten ODA- [7]; IDA-Defekte [2] und Transpositionen [3] isoliert auf. Radial Spokes und Central Pair Defekte traten nie isoliert auf (Tabelle 4 und Abbildung 16).

Tabelle 4: Strukturell-funktionelle Befunde bei PCD

Patienten mit PCD Diagnose	38	
weiblich	20	
männlich	18	
Alter zum Zeitpunkt der strukturellen Analyse:	Median: 8.1J, Mittel: 11.8J	
Biopsie Lokalisation ⁽¹⁾		
Bronchialbiopsie, meist Zange (<i>bis 2010: 90%</i>)	30	(75%)
Nasalbiopsie, nur Brush (<i>seit 2010: 100%</i>)	10	(25%)
Video Analyse (HSVA)	33	
Befunde ⁽²⁾ :		
normal	9	(27.3%)
anormal	18	(54.5%)
inkonklusiv	6	(18.2%)
TEM Analyse	38	(100%) ⁽³⁾
Befunde		
ODA	23	(60.5%)
(als isolierter Befund):	7	(18.4%)
IDA	20	(52.6%)
(als isolierter Befund):	2	(5.3%)
Transpositionen	14	(36.8%)
(als isolierter Befund):	3	(7.9%)
Radial Spokes Defekt	8	(21.0%)
(meist mit Transposition)		
CP Defekt	10	(27.0%)
(nie als isolierter Befund)		
Achsen desorientiert	21	(55.2%)
(kein primäres PCD Zeichen)		

(1) Überwiegend bronchial, da die meisten Diagnosen vor 2010 erfolgten. Bei zwei Patienten war Material von 2 Lokalisationen vorliegend.

(2) Ältere Videoanalysen waren aufgrund der Technik rein cursorisch und daher weniger aussagekräftig. High-Speed Analyse seit 2010.

(3) Aufgrund der gesetzlichen Vorgaben müssen in der Schweiz alle PCD Fälle ultrastrukturell mittels TEM bestätigt werden (Situation: 2016). In den meisten Fällen wurde diese Diagnose von einem pathologischen Resultat in der HSVA begleitet (ab 2010). Die meisten Patienten zeigten ultrastrukturell mehrere Befunde, so dass die Summe der einzelnen spezifischen TEM Befunde über 100% liegt.

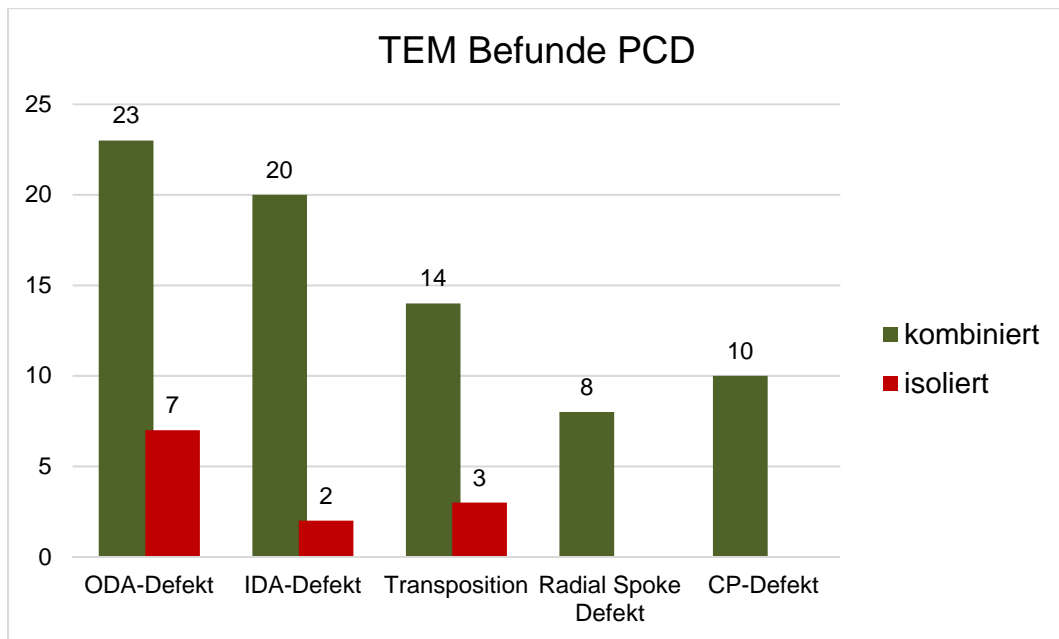


Abbildung 16: TEM Befunde bei PCD

Entgegen den Beschreibungen in der Literatur¹²⁰, traten in den untersuchten TEM Querschnitten von PCD Patienten einige Befunde nie isoliert auf, so die Radial Spokes und besonders die CP-Defekte. In 10 PCD Fällen (27%) waren CP-Defekte mit anderen Störungen kombiniert. In 15 Fällen waren CP Defekte jedoch von keinen anderen HSVA und TEM Befunden begleitet und wurden daher nicht mit einer PCD Diagnose assoziiert. Es bestanden jedoch Zeichen mangelhaft fixierten Materials (zerrissene Plasmamembranen, geschwollene oder geschrumpfte Zilienquerschnitte) sowie unscharfe, zentrale Schatten mit elektronendichtem Material. Sie wurden nicht als pathognomonisch interpretiert. Beispiele für sekundäre CP Defekte sind in Abbildung 17 aufgeführt.

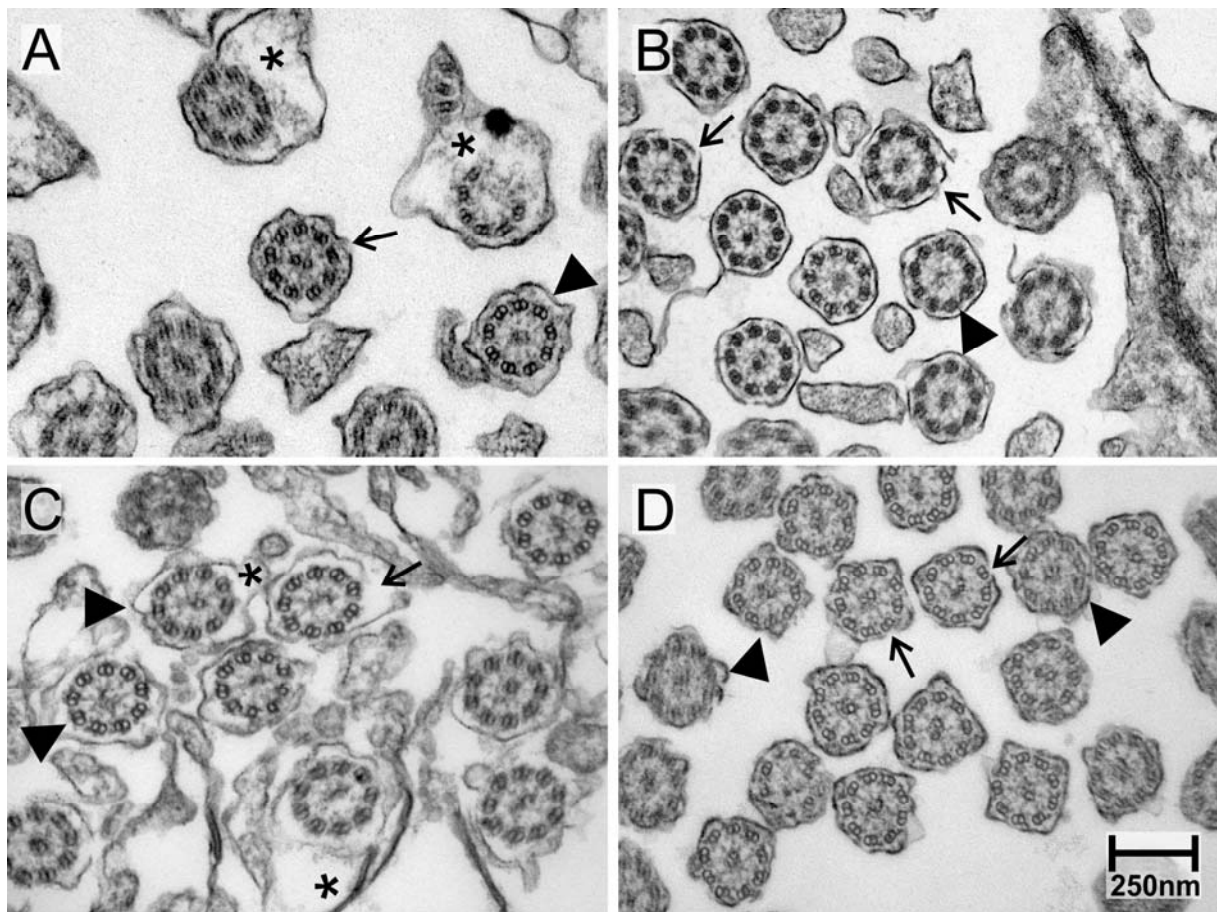


Abbildung 17: CP-Defekte, sekundär

Zilienquerschnitte im TEM, 70'000x, Pfeilköpfe: CP-Defekte, Pfeile: Membrandefekte, Sterne: Zytoplasmaschwellung. Alle Beispiele von Patienten bei welchen keine PCD ausgesprochen wurde. **A:** 4-jähriges Mädchen mit chronischem Husten. Vitalanalyse mit normaler CBP und CBF (Mittel: 12Hz) mit Partikeltransport. Defekte CP in 5 von 45 Bildern. Diese 5 Felder zeigten klare Zeichen von Fixationsproblemen. 40 Bilder mit normalem axonemalem Befund. **B** 10-jähriges Mädchen mit chronischer Rhinitis und Otitis media, vital unauffällig. CP Veränderungen in 7 von 73 Feldern. **C:** 3-jähriger Knabe mit chronischem Husten, Vitalanalyse unauffällig. Defekte CP in 3 von 30 Bildern. **D** 10-jähriges Mädchen mit Rhinitis, Situs inversus und normalem nasalen NO zum Zeitpunkt der Biopsie. CP Veränderungen in 5 von 50 Bildfeldern. In 45 Feldern normale axonemale Befunde. Balken: 250nm

4.3 Klinisch-anamnestischer Kontext PCD Betroffener

Einige der erhobenen anamnestischen Daten stammen aus dem anonymisierten Anmelderegister der in Bern durchgeführten PCD Strukturanalysen. Diese Angaben umfassen die gesamte Zahl von 38 Fällen. Zwei Diagnosen wurden im Rahmen internationaler Zusammenarbeit erstellt. Die verbleibenden 36 Fälle entsprachen 55.4% der im 2012 registrierten PCD Fälle in der Schweiz [65]²⁸. In der PCD Kohorte bestand, wie erwartet, eine ausgeglichene Geschlechterverteilung (m: 18, w: 20). Ein Situs Inversus wurde bei 12 Patienten festgestellt (31.6%). Die Diagnosestellung war im Mittel bei 11.8 und im Median bei

8.1 Jahren. Die früheste Diagnose wurde im zweiten Lebensmonat und die späteste mit 43 Jahren gestellt. Es bestand ein klarer Trend zu früherer Diagnostik im Verlauf der Jahre (Abbildung 18).

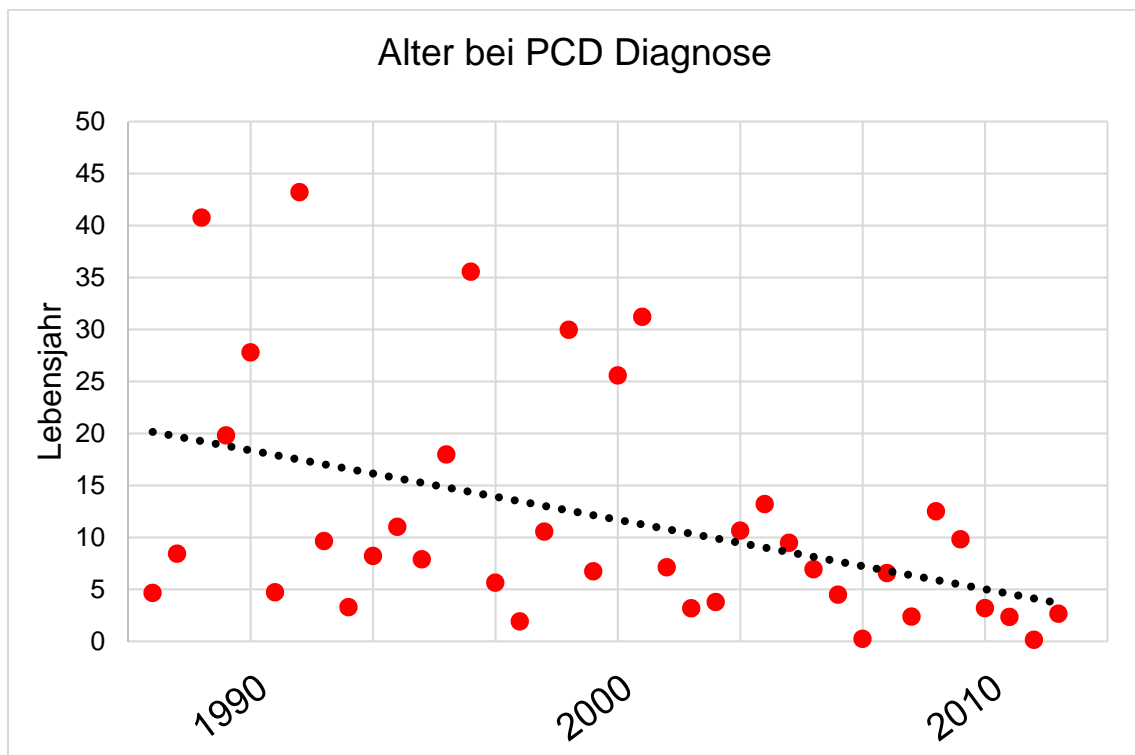


Abbildung 18: Alter bei PCD Diagnose
 Linearer Trend (Methode der kleinsten Quadrate)

Eine detaillierte Analyse der klinischen Verläufe wurde mittels KG Analysen angestrebt. 25 der 38 PCD Fälle konnten kontaktiert werden und 18 stimmten zu, anonymisierte Daten aus ihren Krankengeschichten zur Verfügung zu stellen (2011, vor Inkrafttreten Humanforschungsgesetz). Diese Zahl entspricht 27.7% der registrierten PCD Fälle in der Schweiz. Dennoch gestaltete sich die Auswertung der anamnestischen Angaben als schwierig und zur Formulierung umfangreicher allgemeingültiger Aussagen war die Fallzahl zu klein. Kursorisch konnten die folgenden Befunde aus den Krankengeschichten erhoben werden: Von 18 Rückläufen waren 12 Frauen und 6 Männer. In Tabelle 5 sind die auffälligsten Befunde aufgelistet in Relation zu den 18 Fällen und in Anlehnung an die bekannten Symptome gemäss Tabelle 1.

Tabelle 5: PCD Anamnese

Befund	Auftreten	Häufigkeit
Familienanamnese mit PCD	2	11%
Situs Inversus	7	39%
Dysmorphien	2	11%
Neonatales oder frühkindliches Atemnotsyndrom	6	33%
Rezidivierende Bronchitiden	17	94%
Rezidivierende Pneumonien	11	61%
Bronchiektasen	11	61%
Rezidivierende Sinusitiden	13	72%
Rezidivierende Otitiden	12	66%
Seromukotympanon	9	50%
Paukenröhrchen Einsatz	6	33%
Gehörprobleme	8	44%
Tiefes nasales NO (100% der Fälle ab Verfügbarkeit des Testes)	9	50%

15 Patienten hatten wiederholte spirometrische Untersuchungen, allerdings konnte keine eindeutige, sich wiederholende pathologische Gesetzmässigkeit bei deren Auswertung aufgedeckt werden. Bezüglich in Antibiogrammen rapportierter Bakteriologien war der häufigste Keim *Haemophilus influenza* (14), gefolgt von *Streptococcus pneumoniae* (13), *Staphylococcus aureus* (9) und *Pseudomonas aeruginosa* (8). Das Verlaufsspektrum und die Prognose umfasste, ebenso wie die Klinik, ein sehr breites Spektrum: von nahezu symptomfrei ohne jegliche Massnahmen (2 Fälle), über gute Verläufe bei disziplinierter Atemtherapie, rigoröser Infektbekämpfung und teils antibiotischer Prophylaxe (Mehrzahl), bis zu invalidisierenden Verläufen, teils mit notwendiger Lungentransplantation, waren alle Schattierungen vorhanden.

5 Diskussion

Die primäre ziliäre Dyskinesie wird nicht adäquat erfasst. Dies wird zum Beispiel in der Diskrepanz zwischen registrierter Prävalenz in der Schweiz (1:120'000)²⁸ und dem erwarteten Wert von 1:10'000 bis 1:20'000²⁴⁻²⁷ widerspiegelt. Die Gründe sind (A) ein breites Symptomenspektrum mit sehr unterschiedlichen Manifestationsstärken und Verläufen, (B) ein breites Spektrum an möglichen Mutationen mit einer breiten Palette an funktionellen und strukturellen Merkmalen. (C) Die PCD ist eine seltene Erkrankung, die es kleinen Institutionen nicht erlaubt, grosse diagnostische Erfahrung zu sammeln. (D) Einige analytische Verfahren sind nur mangelhaft standardisiert.

Es wird angenommen, dass rund 1/3 der Patienten mit primärer ziliärer Dyskinesie (PCD) durch genetische Analysen bisher noch nicht erfasst werden^{139,140}. Zudem sind die genetischen Tools nicht weit verbreitet und nur in grösseren nationalen Zentren verfügbar. In dieser Situation behalten die funktionelle Videoanalyse (HSVA) und die ultrastrukturelle Diagnostik am TEM grosse Bedeutung, besonders in Anbetracht der mangelhaften oder zu späten Erfassung. Speziell die prinzipiell einfach zu implementierende HSVA kann eine wichtige Rolle in der besseren Erkennung von PCD Betroffenen übernehmen, sofern die Methodik unkompliziert und tragbar ist, sowie gut reproduzierbare, selektive und sensitive Resultate liefert. Für einen Teil der PCD Diagnosen, wird, nach entschiedener Triage, die TEM Untersuchung die Analytik der Wahl bleiben.

Die Darstellung von 35 Jahren Erfahrung und deren kritische Diskussion soll helfen, die Voraussetzungen für eine hohe Verfügbarkeit und hohe Qualität der PCD Diagnostik zu verbessern.

Der anamnestische Kontext, der in Bern funktionell und strukturell untersuchten PCD Verdachtsfälle und ausgesprochenen Diagnosen, steht in Einklang mit den in der Literatur vorhandenen aktuellen Angaben^{75,85,130,141}. Die diagnostische Fragestellung PCD ist zu 100% aus der respiratorische Problematik motiviert. In den vergangenen 35 Jahren ist in der Kohorte ein signifikanter Trend zu früherer Analytik, aber auch zu früherer Diagnosestellung zu sehen, was den dringenden Forderungen nach früher Diagnose zwecks Vermeidung früh einsetzender Langzeitschäden entgegenkommt^{28,29}. Sowohl in der analysierten, als auch in der diagnostizierten Kohorte bestehen keine Geschlechtspräferenzen.

Das klinische Spektrum der hier rapportierten PCD Betroffenen war sehr breit und zeigte eine enorme Heterogenität, sowohl bezüglich der recht unspezifischen Symptomatologie, der Intensität und dem Verlauf. In einer Subkohorte der PCD Betroffenen wurde anamnestisch ein Spektrum von asymptomatischen Verläufen bis Langzeitverläufen mit schwersten Beeinträchtigungen gefunden. Diese Heterogenität ist eines der Hauptprobleme der

Erkennung der PCD als Entität in der Klinik. PCD-Diagnostizierte wiesen zu 100% respiratorische Symptome auf, meist rezidivierend, in jedem Fall anamnestisch. In Anbetracht der Zuweisungssymptomatik ist dies aber offensichtlich. Das Muster der Symptome entsprach aber über weite Teile den in der Literatur publizierten Schemata. Wir werten diese gute Übereinstimmung als Qualitätszeichen der an der Universität Bern durchgeführten funktionell-strukturellen Analytik.

5.1 Problematik der PCD Diagnostik

Die Analytik der PCD verbleibt trotz jahrelanger Erfahrung und Erforschung ein schwieriges Unterfangen. Die strukturelle und besonders funktionelle Analyse, sowie deren Interpretation ist komplex und wird von einer grossen Zahl – auch sekundären – Gegebenheiten beeinflusst. In beiden Ansätzen wäre die stringente Definition des methodologischen Kontextes entscheidend, was aber leider nicht der Fall ist. Es bestehen sehr viele Konsenspublikationen, mit dem Ziel, das diagnostische Prozedere zu vereinheitlichen^{6,29,30,93,94,142,143}. Dabei werden analytische Verfahren meist nur allgemein beschrieben und nicht im Detail auf konkrete Verfahren und die mikroskopische Präparationsweise eingegangen. Im Bereich der funktionellen und strukturellen Diagnostik sind in der neusten ERS Guideline der Wert der HSVA und TEM Verfahren klar untermauert⁹³, wobei explizit auf fehlende Standardisierung der HSVA eingegangen wurde. Hauptmotivation dieses Textes ist daher praktisch umsetzbare Ratschläge von der Gewebeentnahme, Datenaufnahme bis zur Interpretation der mikroskopischen Befunde zu erteilen, die aus 35-jähriger Erfahrung am Institut für Anatomie der Universität Bern herrühren.

Im täglichen Umgang mit zugesandtem bioptischem Material ist man oft mit suboptimalen Bedingungen und beschädigten oder beeinträchtigten Gewebeproben konfrontiert. Dazu gehört ein eingeschränkter Vitalstatus, der durch das Brushing traumatisierten Zellen oder die Anwesenheit von hochviskösem Schleim oder Bakterien. Diese Bedingungen können das Resultat sowohl der HSVA als auch der TEM sekundär beeinflussen. In der Literatur finden sich kaum Beschreibungen solcher Probleme, obwohl in der mündlichen Kommunikation mit Kollegen aus dem Arbeitsfeld dies sehr wohl thematisiert wird. Um die Belastung der Patienten in einem vernünftigen Mass zu halten, sind Wiederholungen der schmerzhaften Brushings oder der hochinterventionellen Bronchoskopien möglichst zu vermeiden.

5.1.1 Anforderungen an die Gewebeentnahme

Es muss bewusst sein, dass Flimmerepithelzellen nach einem Brushing oder einer Biopsie immer in einem komplett artifiziellen Kontext beobachtet werden. Dies betrifft die zelluläre und gewebliche Integrität mit Verlust des Organkontextes, aber auch die periziliäre Umgebung, welche in komplexer Interaktion mit den motilen Zilien steht¹⁴⁴⁻¹⁴⁷. Die Qualität der periziliären

Mukusschicht hat direkte Auswirkungen auf das HSVA Resultat und kann auch den Fixationszustand für die TEM Analytik negativ beeinflussen.

Präbioptisch muss daher eine gute Nasen- oder Luftwegstoilette, mit allfälliger antibiotischer Sanierung angestrebt werden. In Bern zeigten Bronchialbiopsien und -brushings weitaus homogenere und besser beurteilbare Resultate als die Nasalbrushings, was ebenfalls von anderen Analytikern bestätigt wurde (persönliche Kommunikation, Universität Basel). Dies kann auch in Verbindung mit den bei Kindern meist etwas verschleimten Nasensituation ("Schnudernase") sein^{148,149}.

Es wurde zudem beschrieben, dass im Bronchialtrakt die Schlagfrequenz (CBF) höher und die Viskosität tiefer sein kann (¹⁵⁰⁻¹⁵² und eigene, nicht statistisch geprüfte Beobachtungen). Brushings ergeben meist genügend Zellmaterial, in Form einzelner Zellen, kleiner Zellgruppen und manchmal ganzer Zellbänder, die eine Beurteilung zulassen. Biopsien mittels kleiner (bronchoskopischer) Zangen (Forceps) ergeben auch grössere Epithelkonglomerate, die einem natürlicheren geweblichen Kontext entsprechen. Aufgrund der deutlich höheren interventionellen Belastung für die Patienten sollten jedoch bronchoskopische Entnahmen elektiv nur in klar umrissenen Situationen angewandt werden. Im Rahmen einer aus anderen Gründen notwendigen Bronchoskopie ist aber dieser Entnahmeweg durchaus empfehlenswert.

Die Anwendung von Lokalanästhetika ist zu vermeiden. Die Datenlage über deren Einflüsse ist kontrovers: während einige Autoren keine Effekte feststellten¹⁵³⁻¹⁵⁶, wurde von anderen eine signifikante Verminderung der CBF oder sogar Ziliostase beschrieben¹⁵⁷⁻¹⁶¹. Auch Einflüsse globaler Anästhesie werden unterschiedlich dokumentiert^{128,162,163}.

Diagnostische Ansätze mittels Flimmerepithelgewebekultur haben den Vorteil, dass infektsbedingte Einflüsse vermieden und die Gewebeintegrität aufrecht erhalten werden kann^{164,165}. Der grosse Aufwand und die geringe Verfügbarkeit der Technik sind hier hinderlich. Zudem sind auch in Kulturen die periziliären Bedingungen artifiziell (HSVA!).

5.1.2 Präparatorische Anforderungen

Die Vitalität entnommener Zellen ist in adäquaten Kulturmedien über Stunden gegeben, wie in der Literatur¹⁶⁶ und in unseren Zeitserien gezeigt wurde. Die Aufbewahrung während dieser Serien geschah bei Zimmertemperatur (keine Vergleichswerte mit anderen Temperaturen), was auch längere Transportwege aus peripheren Praxen und Spitälern zulassen sollte. In Anbetracht der kaum vermeidbaren bakteriellen Kontamination der Patienten mit der Verdachtsdiagnose, ist bei der Vorbereitung der Transportmedien auf Sterilität zu achten. In den längsten unserer Zeitserien (+24 Stunden) führte bakterielles Wachstum beim HSVA Resultat zu Beeinträchtigungen.

Einflüsse der Temperatur auf die Motilität sind bekannt, wobei nicht von einer linearen Temperatur-Frequenz Relation ausgegangen werden kann^{25,127,167,168}. Auch das Schlagmuster (CBP) ist temperaturabhängig, wobei nicht klar ist, ob dies mit temperaturabhängigen Veränderungen der periziliären Viskosität oder der Zilienmotorik zusammenhängt¹⁶⁹. HSVA bei tiefen Temperaturen¹⁷⁰ können daher zu Fehlinterpretationen führen. Im analytischen Setting in Bern wird mittels Heizeinrichtung die Temperatur während der Beobachtung konstant bei 30°C gehalten. Diese Temperatur entspricht den im Nasenraum (Concha nasalis inferior) physiologisch vorhandenen Werten^{171,172}. Der etwas unter der Körpertemperatur (37°C) liegende Wert trocknete das Präparat weniger schnell aus und erlaubte längere Beobachtungszeiten ohne die Verwendung einer umständlichen und teuren Klimakammer. Zudem ist die Temperatur-CBF Relation zwischen 30°C und 40°C sehr flach²⁵. Auf Änderungen des pH und der Osmolarität soll die Motilität, respektive die CBF weniger empfindlich reagieren^{167,173}. In unseren Zeitserien führte jedoch die kontinuierliche Austrocknung mit offensichtlicher Erhöhung der Osmolarität zu einem Erlahmen des Zilienschlages (keine explizite Bestimmung der Osmolarität im Medium).

Seit einigen Jahren werden während der Gewebegewinnung möglichst zwei Proben/Brushes entnommen, wobei eine direkt in das Fixativ für die TEM Analytik eingebracht wird. Die Qualität der Aufnahmen dieser sofort fixierten Gewebe erwies sich als signifikant besser und zeigte intaktere Zellstrukturen.

Grundsätzlich ist eine zuverlässige mikroskopische PCD Diagnostik nur mit adäquat vorbereitetem Material möglich.

5.1.3 Anforderungen an die Datenerhebung und Dateninterpretation

In der Vitalanalytik mit ihren dynamischen Phänomenen und video-basierten Befunden ist die Interpretation enorm komplex. Die Systematisierung und Reproduzierbarkeit ist noch nicht gut entwickelt und lässt einen breiten Spielraum, der zu Fehldeutungen führen kann. Obwohl die Phänomenologie des Zilienschlages besonders in der Biophysik sehr intensiv erforscht wird^{42,46,51,146,174-177}, fehlt in der Diagnostik eine klare "Grundlinie" des normalen, effizienten Zilienschlages. Was ist die "normale" CBF, was ist das "normale" CBP? Bereits der Normalbefund der CBF schwankt je nach Publikation von 7 – 20Hz¹²⁶⁻¹²⁸.

Noch schwieriger ist die systematische Klassifizierung des faktisch vierdimensionalen Schlagmusters. Was ist für die Effizienz des Transportes bedeutsam? Was ist noch normal? Was ist pathologisch? Dies führt dazu, dass die HSVA nach wie vor mehrheitlich deskriptiv geschieht¹²⁹. Diese Vereinfachung birgt jedoch das Risiko von Fehlinterpretationen. Während in der Literatur meist klare Phänomene und Bilder, mit problemloser Diskriminierung und guter Reproduzierbarkeit in vielen Bildfeldern publiziert werden, treten in der täglichen Analytik viel

unklarere und inhomogenere Befunde auf, die oft, mangels Gewebe, an nur wenigen Stellen erhoben werden können. Auf einzelnen Bildfeldern sowie verschiedenen Gewebestückchen eines einzelnen Patienten treten enorme Inhomogenitäten auf (siehe Abbildung 19), was seit langer Zeit bekannt ist¹²⁷.

Die Ursachen dieser Frequenzinhomogenitäten stehen in Verbindung mit visköser Verschleimung und mechanischer Behinderung (Zelltrümmer, enge Nachbarschaft). Diese sind aber oft mikroskopisch nicht eruierbar. In unseren Analysen waren normale CBP begleitet von guter interzellulärer Koordination (mit sogar sichtbarem Partikeltransport) von einem breiten Frequenzspektrum begleitet.

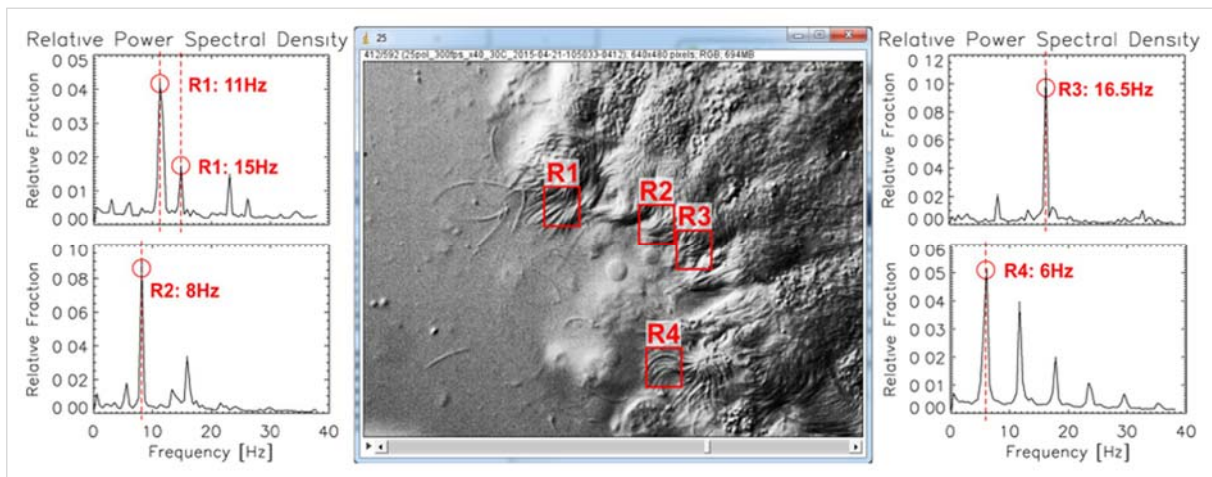


Abbildung 19: Frequenzinhomogenitäten

Regionale Differenzen innerhalb eines Bildfeldes. Regionen R1 – 4 mit ihren entsprechenden Fourierpektren und resultierenden CBF. Probe eines ansonsten als unauffällig klassierten Patienten (HSVA und TEM).

Die Phänomenologie des Zilienschlages wird bei weitem nicht komplett verstanden, weder was die Steuerung, Kraftübertragung noch die Interaktion mit der Umgebung angeht. Besonders in der biomedizinischen Forschung werden viele physikalische Fakten ignoriert, die einen drastischen Einfluss auf das Verständnis und die Effizienz des Zilienschlages haben. So führt der banale Umstand der Kleinheit der Kinozilien zu einer komplett anderen Beschreibung der Fluidodynamik in der "Welt der kleinen Reynoldszahlen"⁶¹. Intuitive Erklärungen verlieren dabei ihre Gültigkeit. Der periziliäre Flüssigkeitsfilm, sogar die tiefervisköse Hypophase werden nicht mehr als "Newtonsche", sondern als "Cassonsche" Flüssigkeit bezeichnet^{46,54,177}.

Auf ersten Blick mag dies für die PCD Diagnostik wenig Einfluss haben, doch beeinflussen diese Gegebenheiten die Interpretation jedes HSVA Resultates. Alle Umstände der HSVA werden dabei beeinflusst, sei es die CBF, CBP, die Bildung der metachronalen Welle, Effekte der Probengröße (Einzelzelle, Zellgruppe, Band) oder Effekte einer Verschleimung. In diesem

Kontext ist nicht verständlich, wie gewisse Postulate aufgestellt werden können, ohne dass dafür die notwendigen Erklärungen vorhanden sind. So wird dem Auftreten von Partikeltransport in einer Biopsie keine diagnostische Bedeutung beigemessen¹¹⁶. In der komplexen und zurzeit noch nicht verstandenen Kaskade von Vorgängen, die zum effizienten Transport führen, muss unserer Ansicht nach, dem Phänomen am Schluss der Kette eine relevante Bedeutung zugesprochen werden.

Ebenso unklar sind Betrachtungen, welche der Frequenzanalyse geringere Bedeutung als der Musteranalyse zuordnen wollen⁷³. In der Tat sind auch in unseren Proben normale Transportphänomene und Schlagmuster mit unterschiedlichen CBF aufgetreten (bei generell Normalbefunden). Daraus sollte jedoch keine Gesetzmässigkeit kreiert werden, da die Interaktionen zwischen CBF, CBP und der Kraftübertragung äusserst komplex und voneinander abhängig sind⁵⁹. Die generelle Forderung, dass die Vitalanalyse nur an Zellgruppen durchgeführt werden kann^{129,178}, ist nachvollziehbar, da die Zerstörung des Gewebeumfeldes zur Beeinträchtigung der einzelnen Zelle führt. Ob eine gut erhaltene Einzelzelle nicht dennoch beurteilt werden kann, ist nicht bewiesen.

Solange die Komplexität der Zilienmotilität nicht erfasst ist und nicht systematisch in die Interpretation der HSVA einfließen kann, mag es erlaubt sein, Vereinfachungen anzuwenden und die deskriptiven Elemente zu ordnen.

Im in Bern entwickelten Interpretationsschema kommen die folgenden Kriterien zur Anwendung: (i) Bei inhomogenen Befunden, werden gewichtete Durchschnitte der normal erscheinend Regionen errechnet, sofern dies der Mehrheit der Begutachtungsfelder entspricht. Durch die vielen äusseren Einflüsse ist die Gefahr gross, dass sekundäre Störungen das Bild verfälschen und so falsch-pathologische Ergebnisse liefern. (ii) Die Beobachtung von schnellem, gerichtetem Partikeltransport (Zellfragmente, Erythrozyten) und auch die Rotation oder Translation herausgelöster Zellen¹⁶⁸ werden als Hinweis für einen effizienten Zilienschlag gewertet. (iii) Sind bei spärlichem Biopsiematerial nur Einzelzellen sichtbar und zeigen diese eine normale Motilität, wird dies als aussagekräftig interpretiert.

Aktuell werden Methoden entwickelt, welche eine systematischere Charakterisierung der Zilienmotilität erlauben, basierend auf Vektoranalysen¹⁷⁹, Bewegungsdekomposition¹⁸⁰, sowie einer eigenen Entwicklung im Institut für Anatomie zur Aktivitätsgewichtung.

Weit geringer sind die Unklarheiten bei der TEM Analytik. Es ist dort ein Portfolio klarer Kennzeichen definiert, die pathognomonisch und gut zu identifizieren sind. Es muss aber berücksichtigt werden, dass, mit Ausnahme der Transposition, alle weiteren Zeichen unter gewissen Bedingungen imitiert werden können. So kann die Abbildung der ODA, IDA und Radial Spokes durch schlechten Erhaltungszustand der Probe (Fixation, floride bakterielle Infekt) mangelhaft sein. Die in der Literatur beschriebenen isolierten Defekte des zentralen

Paares (CP-Defekt) als PCD Kennzeichen traten in Bern nur in Kombination mit anderen Kennzeichen auf. Isoliert waren sie nur bei schlechtem Erhaltungszustand der Strukturen vorhanden, bei sonst unauffälligem Gesamtbefund.

5.1.4 Technische Anforderungen

Die HSVA ist eine zuverlässige Methode, welche rasch und mit akzeptablem Aufwand Verdachtsfälle der PCD triagiert. Sie kann bei entsprechender Vereinheitlichung der Methodik auch in kleineren Institutionen angeboten werden. Das teuerste Zubehör ist ein Mikroskop, welches über ein Verfahren zur interferometrischen Kontrastgebung der vitalen Zellen verfügt (gut geeignet: Differenz Interferenzkontrast, DIC-Nomarski). Gemäss dem Nyquist Theorem muss zur Bestimmung der CBF mindestens die doppelte Bildrate (fps) angewandt werden¹⁸¹, was bei einer angenommenen maximalen CBF von 25Hz bei 50fps liegt. Das in der Literatur oft zitierte SAVA System¹⁸² reicht mit 120fps dafür aus. Obwohl dieses bereits 16 Jahre genutzte Tool von vielen als Referenzsystem bezeichnet wird, hat es, neben einem sehr hohen Preis, einige entscheidende Nachteile, die es als wenig geeignet erscheinen lassen. Neben einer für heutige Verhältnisse sehr tiefen Aufnahmezeit ist das System als Blackbox konzipiert, welche die Weiterverarbeitung der Bildserien nicht vorsieht.

Zur Begutachtung des Schlagmusters sind deutlich höhere Aufnahmezeiten notwendig, um eine flüssige Darstellung aller Sequenzen zu ermöglichen und um die Zilienbewegung kontinuierlich zu verfolgen. Bei einer angenommenen CBF von 14Hz hat die schnellere Schlagkomponente (*power* oder *fast stroke*) eine Dauer von unter 20ms⁴⁹. Um die gesamte schnelle Bewegungssequenz einigermaßen nachverfolgbar darzustellen sind 5 Bilder notwendig (Start, $\frac{1}{4}$ Weg, $\frac{1}{2}$ Weg, $\frac{3}{4}$ Weg und Ende). Dies resultiert in einer Aufnahmezeit von 250/sec (5 Bilder in 20ms). Die Aufnahme von Bildserien in hoher Frequenz (bis 500fps) kann heutzutage mit preiswerten (<CHF 1000.-) USB 3 Kameras an einem PC Interface realisiert werden. Die Kameraschnittstellen erlauben ein transparentes Handling der Daten, welches eine Weiterverarbeitung in zugeschnittenen Programmen (z. B. ImageJ¹³⁷, Freeware) zulässt. Auf ImageJ-Basis sind wir daran, ein Gratis-Tool anzubieten, welche die Verarbeitung, Analyse und Interpretation von Zilienvideos erlaubt.

5.2 Praktischer Leitfaden

Es mag erstaunen, dass in einem so intensiv erforschten Gebiet wie der PCD, recht viele diagnostische Prozedere, Befunde und Interpretationen nicht endgültig definiert sind. Die Literatur und die eigenen Erfahrungen auf dem Gebiet der PCD machen jedoch klar, dass nur ein Zusammenspiel verschiedener analytischer Schritte in einer möglichst gut definierten Sequenz zu einer effizienten Diagnostik mit hoher Sensitivität und Spezifität führt. Aus unseren Beobachtungen leiten wir ein an Nüsslein et al. 2013¹¹⁶ angelehntes Schema der Sequenz der analytischen Schritte inklusive allfälliger Iterationen in Abbildung 20 ab.

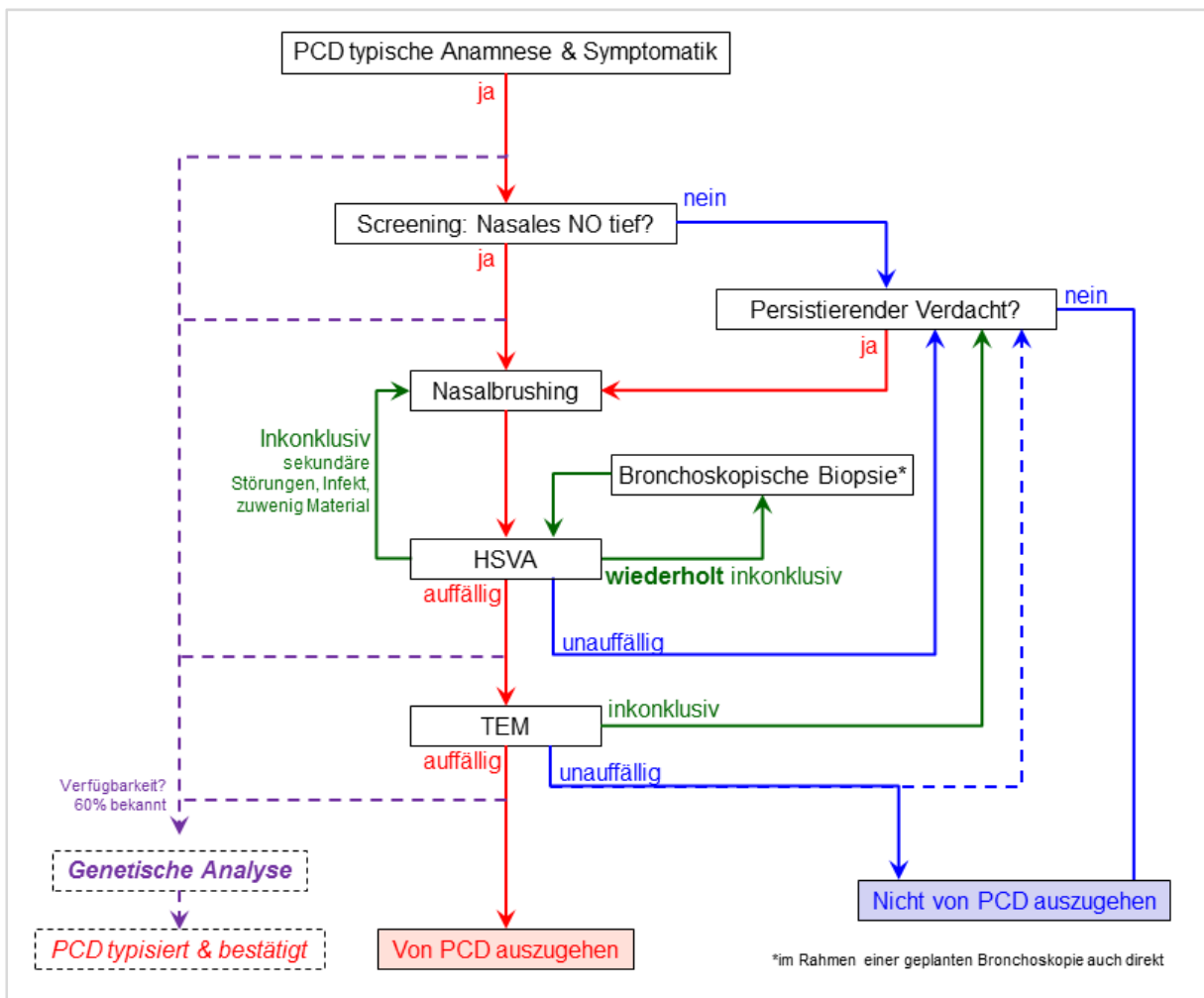


Abbildung 20: PCD Diagnoseschema Bern

Aufgrund von relativ häufigen inkonklusiven Resultaten, oft durch sekundäre Problematiken (Mucus, Infektion, schlechter Erhaltungszustand, wenig Material) bedingt, können mehrere Iterationen im Verlauf notwendig sein. Dabei ist natürlich die Belastung der Patienten durch das schmerzhaftes Brushing oder die recht invasive Bronchoskopie miteinzuberechnen. Es muss den Klinikern überlassen werden, den Zeitablauf zu bestimmen und allfällige Nachuntersuchungen mit einer dem Lebensalter angepassten Latenz zu wählen, sofern die diagnostischen Konsequenzen dies zulassen.

Wie in dieser Studie gezeigt, werden die Patienten im betrachteten Kollektiv zum Zeitpunkt der Analyse immer jünger und der Forderung nach möglichst früher Diagnose wird nachgekommen²⁹. Da jedoch eine spezifisch-kausale Therapie fehlt, muss der optimale Zeitpunkt der Analytik (traumatischere Intervention mit geringerem Erfolg und Gefahr mehrerer Iterationen beim Kleinstkind versus etwas spätere Diagnostik) gefunden werden. Dies ist aber weder Teil dieser Arbeit noch in unserer Kompetenz.

Aktuell (Ende 2016) wird die genetische Analyse (violett in Abbildung 20) in Bern nicht regelmässig angewandt und das Spektrum der detektierten Mutationen ist im Aufbau. Natürlich wird dieses Schema bei steigender Verfügbarkeit, Analysebreite und Erschwinglichkeit der genetischen Analyse substantielle Änderungen erfahren. Während die strukturell-funktionelle Analyse rein deskriptiv ist, bietet die Genetik den Vorteil der konklusiven Typisierung. Da jedoch 1/3 der Fälle noch gar nicht definiert sind, verbleibt eine diagnostische Lücke, die vermutlich nie vollständig geschlossen werden kann.

Aufgrund der in den letzten 35 Jahren gemachten Erfahrungen in funktionell-struktureller PCD Analytik, welche in dieser Arbeit systematisch zusammengetragen und analysiert wurden, schlagen wir, in Verbindung mit dem in Abbildung 20 präsentierten Schema eine Reihe praktischer Leitlinien zur Verbesserung der strukturell-funktionellen PCD Analytik vor.

- Gebrushtes oder biopsiertes Zellmaterial soll aus einer intakten, infekt- und entzündungsfreien Region mit möglichst wenig zähem Schleim, Eiter oder Blut entnommen werden. Es ist auf eine penible Nasentoilette und abschirmende Vorbehandlung zu achten.
- Die Zeitspanne zwischen Entnahme und Analyse unter dem LM ist möglichst kurz zu halten. Im entsprechenden Medium kann jedoch von Stunden ausgegangen werden, bis sekundäre Einflüsse relevant werden. Zusendungen aus weiten Teilen der Schweiz sind daher möglich (gute Erfahrungen per Bahn / Velokurier aus Luzern).
- Ein Teil des Gewebes soll direkt in Fixativ (Glutaraldehyd) eingebracht werden, da der Strukturerehalt im TEM verbessert ist.
- Die Vitalanalytik erfordert kein teures Equipment. Ein Standard-Mikroskop mit DIC ausgestattet mit einer modernen USB3 Kamera an einem Standard Windows PC erlaubt Aufnahmen im Bereich der notwendigen 300fps. Offene Systeme speichern die Daten transparent in offenen Formaten, welche die Bearbeitung mit der Open Source Software ImageJ erlauben und auch Datenaustausch zwecks konsultatorischer Hilfestellung zulassen. Eine Dezentralisierung der Vitalanalytik, welche dadurch zu einem effizienten Screening Verfahren würde, ist anzustreben. Die Zilienarbeitsgruppe in Bern entwickelt zurzeit ein einfach anzuwendendes Programm zur Motilitätsanalyse, welche dieser Bestrebung weiter Vorschub leisten sollte.

- Während der Analyse soll eine konstante Temperatur der Probe von 30°C herrschen. Unter einem Deckglas ist der Flüssigkeitsfilm ausreichend um den Zilienschlag nicht relevant zu beeinflussen. Wegen eintretender Austrocknung sollte ein Objektträger nicht länger als 10 Minuten begutachtet werden. Danach wird die Motilität beeinträchtigt. In einer mikroskop-assoziierten Klimakammer kann die Beobachtungszeit verlängert werden. Aus Gründen der Stichprobenstatistik sind aber die kürzere Begutachtung möglichst vieler Proben / Objektträger anzustreben.
- Die Beobachtung von effizientem, gerichtetem Partikeltransport (Zelltrümmer, ECs) können als Zeichen effizienter, normaler Zilienmotilität gewertet werden.
- In Anbetracht der grossen Heterogenität an Motilitätsbefunden innerhalb einer Biopsie, einer Zellprobe und sogar innerhalb eines Gesichtsfeldes ist eine bevorzugte Gewichtung der normal beweglichen Regionen anzuwenden, sofern die als unauffällig deklarierten Stellen in der Mehrzahl auftreten und dem generellen Aspekt über viele Analysefelder entsprechen. Die Beeinflussung durch fast immer vorhandene sekundäre Beeinträchtigungen würde die Mittelwerte artefaktbedingt verfälschen und falsch-pathologische Resultate liefern. Einzelzellen, die normale Motilität zeigen, sind als aussagekräftig zu werten.
- Ein HSVA Resultat mit effizienter Motilität, basierend auf normalen CBF und CBP ist, auch ohne sichtbaren Transport konklusiv nicht-pathologisch.
- Im Falle inkonklusiver HSVA wird das Brushing wiederholt, wenn der Verdacht auf PCD klinisch persistiert. Bei nicht sanierbaren oberen Luftwegen ist eine bronchoskopische Gewebeentnahme (Forceps oder Brush) ein valable Alternative. Bronchialproben ergeben tendenziell konklusivere Resultate. Sollte eine Bronchoskopie aus anderen Gründen geplant sein, ist eine solche Entnahme anzustreben.
- Eine TEM Analyse wird bei auffälliger HSVA durchgeführt. Stark sekundär beeinträchtigte Proben (Infekt, Mukus etc.) sind in der Regel auch in der TEM von geringerer Aussagekraft.
- Die TEM Kennzeichen der PCD sind ODA-, IDA- und Transpositionen. Radial Spokes und Central Pair Defekte erfordern eine genauere Betrachtung.
- Mehrere analytische Iterationen sind recht oft erforderlich.

5.3 Abschliessende Bemerkung

Ein Teil der PCD Betroffenen wird immer auf die Analyse mittels beschreibender funktioneller und struktureller Mikroskopie angewiesen sein. Als Screening Methode wird die HSVA eine kostengünstige und einfach anzuwendende Möglichkeit bieten, sofern ein maximaler Grad an Methodenvereinheitlichung erreicht wird. Wie in der ganzen biomedizinischen Forschung gilt der etwas profane Kernspruch "*garbage in, garbage out*" in der hoch diffizilen PCD Diagnostik besonders. In Absenz eindeutiger und umfassender Definitionen vieler Phänomene der struktur-funktionellen PCD Diagnostik ist die nachvollziehbare und reproduzierbare Beschreibung der analytischen Gegebenheiten von eminenter Bedeutung, um die oben erwähnte Vereinheitlichung zu erlangen. Erst dies wird die Diskussion der Befunde in der PCD Forschergemeinde in einer Qualität erlauben, die den Interpretationsspielraum weiter verengen lässt.

In Anbetracht der PCD Beschreibungen ohne ultrastrukturelle Zeichen^{74,111,121} ist die in der Schweiz festgelegte Anforderung nach einer "elektronenmikroskopischen" Bestätigung der PCD Diagnose in Frage zu stellen. Zudem erreichen die HSVA Befunde qualitativ ein Level, dass einige Diagnosen damit alleine ausgesprochen werden können. Werden genetische Tools und immunfluoreszenz-basierte Mikroskopie spezifische Zuordnungen erlauben, sind in diesen Fällen TEM Untersuchungen obsolet. Die involvierten Schweizer Pädiater sollten sich bei der Neuauflage des Geburtsgebrechenliste intensiv dafür einsetzen.

6 Danksagungen

Ich möchte mich bei Herrn PD Dr. med. Stefan A. Tschanz für die ausserordentliche Unterstützung bei der Erarbeitung der Dissertation und die herzliche Betreuung bedanken. Ohne seine reiche Expertise, langjährige Erfahrung in der Ziliendiagnostik und die kompetente Unterstützung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Bei Herrn Prof. em. Dr. med. Peter Burri möchte ich mich für die hilfreichen Beratungen und Anmerkungen bedanken. Herrn Beat Haenni gehört mein Dank für die langjährige, professionelle Probenaufbereitung. Frau Gisela Wirz und Frau Sharon Schmid möchte ich meinen Dank aussprechen für die Zusammenarbeit bei der Gewinnung der Proben. Frau Dr. med. Carmen Casaulta danke ich für das Einbringen der klinischen Komponente in die Arbeit, sowie den Zugang zu den Daten der Patienten der Kinderklinik des Inselspitals Bern. Frau Christina von Rütte bin ich für die Mithilfe bei der Gewinnung der Patientendaten verbunden. Ganz besonders bedanke ich mich an dieser Stelle auch bei den Patienten und Patientinnen, den Eltern, sowie den jeweiligen Ärzten für die Teilnahme an der Studie.

Meinen Eltern Klaus und Christine Ingold, meinem Bruder Lukas Ingold und meiner Frau Sylvana Ingold-Papoutsi möchte ich ganz besonders für die stetige Unterstützung danken.

7 Literaturverzeichnis

1. Afzelius BA. A human syndrome caused by immotile cilia. *Science* 1976;193:317-9.
2. Noone PG, Leigh MW, Sannuti A, et al. Primary ciliary dyskinesia: diagnostic and phenotypic features. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2004;169:459-67.
3. Kennedy MP, Ostrowski LE. Primary ciliary dyskinesia and upper airway diseases. *Curr Allergy Asthma Rep* 2006;6:513-7.
4. Fliegau M, Benzing T, Omran H. When cilia go bad: cilia defects and ciliopathies. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:880-93.
5. Knowles MR, Daniels LA, Davis SD, Zariwala MA, Leigh MW. Primary ciliary dyskinesia. Recent advances in diagnostics, genetics, and characterization of clinical disease. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2013;188:913-22.
6. Lucas JS, Burgess A, Mitchison HM, Moya E, Williamson M, Hogg C. Diagnosis and management of primary ciliary dyskinesia. *Arch Dis Child* 2014;99:850-6.
7. Siewert A. Über einen Fall von Bronchiektasie bei einem Patienten mit situs inversus viscerus *Berliner Klinische Wochenschrift* 1904;41:139-41.
8. Kartagener M. Zur Pathogenese der Bronchiektasien. *BeitrKlinTuberk* 1933;83:489-501.
9. Kartagener M, Stucki P. Bronchiectasis with situs inversus. *ArchPediatri* 1962;79:193-207.
10. Eliasson R, Mossberg B, Camner P, Afzelius BA. The immotile-cilia syndrome. A congenital ciliary abnormality as an etiologic factor in chronic airway infections and male sterility. *NEnglJMed* 1977;297:1-6.
11. Camner P, Mossberg B, Afzelius BA. Evidence of congenitally nonfunctioning cilia in the tracheobronchial tract in two subjects. *Am Rev Respir Dis* 1975;112:807-9.
12. Satir P. STUDIES ON CILIA : II. Examination of the Distal Region of the Ciliary Shaft and the Role of the Filaments in Motility. *J Cell Biol* 1965;26:805-34.
13. Afzelius BA, Eliasson R, Johnsen O, Lindholmer C. Lack of dynein arms in immotile human spermatozoa. *J Cell Biol* 1975;66:225-32.
14. Gibbons IR, Rowe AJ. Dynein: A Protein with Adenosine Triphosphatase Activity from Cilia. *Science* 1965;149:424-6.
15. Pedersen M, Mygind N. Rhinitis, sinusitis and otitis media in Kartagener's syndrome (primary ciliary dyskinesia). *Clin Otolaryngol Allied Sci* 1982;7:373-80.
16. Sleight MA. Primary ciliary dyskinesia. *Lancet* 1981;2:476.

17. Abou Alaiwi WA, Lo ST, Nauli SM. Primary cilia: highly sophisticated biological sensors. *Sensors (Basel)* 2009;9:7003-20.
18. Pennekamp P, Menchen T, Dworniczak B, Hamada H. Situs inversus and ciliary abnormalities: 20 years later, what is the connection? *Cilia* 2015;4:1.
19. Komatsu Y, Mishina Y. Establishment of left-right asymmetry in vertebrate development: the node in mouse embryos. *Cell Mol Life Sci* 2013;70:4659-66.
20. Kathem SH, Mohieldin AM, Nauli SM. The Roles of Primary cilia in Polycystic Kidney Disease. *AIMS Mol Sci* 2014;1:27-46.
21. Ong AC, Wheatley DN. Polycystic kidney disease--the ciliary connection. *Lancet* 2003;361:774-6.
22. Delgehr N, Meunier A, Faucourt M, et al. Ependymal cell differentiation, from monociliated to multiciliated cells. *Methods Cell Biol* 2015;127:19-35.
23. Brown JM, Witman GB. Cilia and Diseases. *Bioscience* 2014;64:1126-37.
24. Alberty J, Stoll W, Rudack C. The effect of endogenous nitric oxide on mechanical ciliostimulation of human nasal mucosa. *Clin Exp Allergy* 2006;36:1254-9.
25. Clary-Meinesz CF, Cosson J, Huitorel P, Blaive B. Temperature effect on the ciliary beat frequency of human nasal and tracheal ciliated cells. *Biol Cell* 1992;76:335-8.
26. Jain B, Rubinstein I, Robbins RA, Leise KL, Sisson JH. Modulation of airway epithelial cell ciliary beat frequency by nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;191:83-8.
27. Jain B, Rubinstein I, Robbins RA, Sisson JH. TNF-alpha and IL-1 beta upregulate nitric oxide-dependent ciliary motility in bovine airway epithelium. *Am J Physiol* 1995;268:L911-7.
28. Kuehni CE, Frischer T, Strippoli MP, et al. Factors influencing age at diagnosis of primary ciliary dyskinesia in European children. *The European respiratory journal* 2010;36:1248-58.
29. Kuehni CE, Lucas JS. Toward an Earlier Diagnosis of Primary Ciliary Dyskinesia. Which Patients Should Undergo Detailed Diagnostic Testing? *Ann Am Thorac Soc* 2016;13:1239-43.
30. Barbato A, Frischer T, Kuehni CE, et al. Primary ciliary dyskinesia: a consensus statement on diagnostic and treatment approaches in children. *Eur Respir J* 2009;34:1264-76.
31. Fawcett DW. The study of epithelial cilia and sperm flagella with the electron microscope. *Laryngoscope* 1954;64:557-67.

32. Manton I. Observations with the Electron Microscope on the Internal Structure of the Zoospore of a Brown Alga *J Exp Bot* 1957;8:294-303.
33. Lindemann CB. The geometric clutch as a working hypothesis for future research on cilia and flagella. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1101:477-93.
34. Wan KY, Leptos KC, Goldstein RE. Lag, lock, sync, slip: the many 'phases' of coupled flagella. *J R Soc Interface* 2014;11:20131160.
35. Lindemann CB, Lesich KA. The geometric clutch at 20: stripping gears or gaining traction? *Reproduction* 2015;150:R45-53.
36. Masyukova SV, Landis DE, Henke SJ, et al. A Screen for Modifiers of Cilia Phenotypes Reveals Novel MKS Alleles and Uncovers a Specific Genetic Interaction between *osm-3* and *nphp-4*. *PLoS Genet* 2016;12:e1005841.
37. Sui H, Downing KH. Molecular architecture of axonemal microtubule doublets revealed by cryo-electron tomography. *Nature* 2006;442:475-8.
38. Downing KH, Sui H. Structural insights into microtubule doublet interactions in axonemes. *Current Opinion in Structural Biology* 2007;17:253-9.
39. Gibbons IR. The relationship between the fine structure and direction of beat in gill cilia of a lamellibranch mollusc. *J Biophys Biochem Cytol* 1961;11:179-205.
40. Levin M. The embryonic origins of left-right asymmetry. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004;15:197-206.
41. Afzelius BA. Asymmetry of cilia and of mice and men. *Int J Dev Biol* 1999;43:283-6.
42. Schatz G, Schneiter M, Ricka J, et al. Ciliary Beating Plane and Wave Propagation in the Bovine Oviduct. *Cells Tissues Organs* 2014.
43. Ishikawa T. Structural biology of cytoplasmic and axonemal dyneins. *J Struct Biol* 2012;179:229-34.
44. Ishikawa T, Sakakibara H, Oiwa K. The architecture of outer dynein arms in situ. *J Mol Biol* 2007;368:1249-58.
45. Gray J. The Mechanism of Ciliary Movement. *Proceedings of the Royal Society B* 1922;93:104-21.
46. Palagi S, Jager EW, Mazzolai B, Beccai L. Propulsion of swimming microrobots inspired by metachronal waves in ciliates: from biology to material specifications. *Bioinspir Biomim* 2013;8:046004.
47. Braiman A, Priel Z. Efficient mucociliary transport relies on efficient regulation of ciliary beating. *Respir Physiol Neurobiol* 2008;163:202-7.
48. Mitran SM. Metachronal wave formation in a model of pulmonary cilia. *Comput Struct* 2007;85:763-74.

49. Sanderson MJ, Sleight MA. Ciliary activity of cultured rabbit tracheal epithelium: beat pattern and metachrony. *J Cell Sci* 1981;47:331-47.
50. Sleight MA, Blake JR, Liron N. The propulsion of mucus by cilia. *Am Rev Respir Dis* 1988;137:726-41.
51. Vilfan M, Kokot G, Vilfan A, et al. Analysis of fluid flow around a beating artificial cilium. *Beilstein J Nanotechnol* 2012;3:163-71.
52. Yi WJ, Park KS, Lee CH, Rhee CS. Correlation between ciliary beat frequency and metachronal wave disorder using image analysis method. *Med Biol Eng Comput* 2003;41:481-5.
53. Eshel D, Priel Z. Characterization of metachronal wave of beating cilia on frog's palate epithelium in tissue culture. *J Physiol* 1987;388:1-8.
54. Siddiqui AM, Farooq AA, Rana MA. A Mathematical Model for the Flow of a Casson Fluid due to Metachronal Beating of Cilia in a Tube. *ScientificWorldJournal* 2015;2015:487819.
55. Yadav V, Duan W, Butler PJ, Sen A. Anatomy of Nanoscale Propulsion. *Annu Rev Biophys* 2015;44:77-100.
56. Salathe M. Regulation of mammalian ciliary beating. *Annu Rev Physiol* 2007;69:401-22.
57. Rompolas P, Patel-King RS, King SM. An outer arm Dynein conformational switch is required for metachronal synchrony of motile cilia in planaria. *Mol Biol Cell* 2010;21:3669-79.
58. Guirao B, Joanny JF. Spontaneous creation of macroscopic flow and metachronal waves in an array of cilia. *Biophys J* 2007;92:1900-17.
59. Hill DB, Swaminathan V, Estes A, et al. Force generation and dynamics of individual cilia under external loading. *Biophys J* 2010;98:57-66.
60. Ryser M, Burn A, Wessel T, Frenz M, Ricka J. Functional imaging of mucociliary phenomena: high-speed digital reflection contrast microscopy. *Eur Biophys J* 2007;37:35-54.
61. Purcell EM. Life at low Reynolds number. *American Journal of Physics* 1977;45:3-11.
62. Horani A, Ferkol TW. Primary ciliary dyskinesia and associated sensory ciliopathies. *Expert Rev Respir Med* 2016;10:569-76.
63. Dinsmore C, Reiter JF. Endothelial primary cilia inhibit atherosclerosis. *EMBO Rep* 2016;17:156-66.
64. Cetrangolo R. [Congenital bronchiectasis (Kartagener's triad) study of two cases]. *Hoja Tisiol* 1950;10:317-21.

65. Leininger CR, Gibson S. Transposition of viscera in siblings. *J Pediatr* 1950;37:195-200.
66. Alonso S. [Research of gene(s) involved in situs inversus. Initial results]. *Arch Mal Coeur Vaiss* 1991;84:633-7.
67. Torikata C, Kijimoto C, Koto M. Ultrastructure of respiratory cilia of WIC-Hyd male rats. An animal model for human immotile cilia syndrome. *Am J Pathol* 1991;138:341-7.
68. Kurkowiak M, Zietkiewicz E, Witt M. Recent advances in primary ciliary dyskinesia genetics. *Journal of medical genetics* 2015;52:1-9.
69. Inglis PN, Boroevich KA, Leroux MR. Piecing together a ciliome. *Trends Genet* 2006;22:491-500.
70. Gherman A, Davis EE, Katsanis N. The ciliary proteome database: an integrated community resource for the genetic and functional dissection of cilia. *Nat Genet* 2006;38:961-2.
71. Lai CK, Gupta N, Wen X, et al. Functional characterization of putative cilia genes by high-content analysis. *Mol Biol Cell* 2011;22:1104-19.
72. Bachmann-Gagescu R. [Genetic complexity of ciliopathies and novel genes identification]. *Med Sci (Paris)* 2014;30:1011-23.
73. Raidt J, Wallmeier J, Hjejij R, et al. Ciliary beat pattern and frequency in genetic variants of primary ciliary dyskinesia. *The European respiratory journal* 2014.
74. Knowles MR, Leigh MW, Carson JL, et al. Mutations of DNAH11 in patients with primary ciliary dyskinesia with normal ciliary ultrastructure. *Thorax* 2012;67:433-41.
75. Milla CE. The evolving spectrum of ciliopathies and respiratory disease. *Curr Opin Pediatr* 2016;28:339-47.
76. Onoufriadis A, Shoemark A, Schmidts M, et al. Targeted NGS gene panel identifies mutations in RSPH1 causing primary ciliary dyskinesia and a common mechanism for ciliary central pair agenesis due to radial spoke defects. *Human Molecular Genetics* 2014;23:3362-74.
77. Olbrich H, Schmidts M, Werner C, et al. Recessive HYDIN mutations cause primary ciliary dyskinesia without randomization of left-right body asymmetry. *Am J Hum Genet* 2012;91:672-84.
78. Castleman VH, Romio L, Chodhari R, et al. Mutations in radial spoke head protein genes RSPH9 and RSPH4A cause primary ciliary dyskinesia with central-microtubular-pair abnormalities. *Am J Hum Genet* 2009;84:197-209.

79. Blanchon S, Legendre M, Copin B, et al. Delineation of CCDC39/CCDC40 mutation spectrum and associated phenotypes in primary ciliary dyskinesia. *Journal of medical genetics* 2012;49:410-6.
80. Wirschell M, Olbrich H, Werner C, et al. The nexin-dynein regulatory complex subunit DRC1 is essential for motile cilia function in algae and humans. *Nat Genet* 2013;45:262-8.
81. Holzmann D, Felix H. Neonatal respiratory distress syndrome--a sign of primary ciliary dyskinesia? *Eur J Pediatr* 2000;159:857-60.
82. Hossain T, Kappelman MD, Perez-Atayde AR, Young GJ, Huttner KM, Christou H. Primary ciliary dyskinesia as a cause of neonatal respiratory distress: implications for the neonatologist. *Journal of perinatology : official journal of the California Perinatal Association* 2003;23:684-7.
83. Ferkol T, Leigh M. Primary ciliary dyskinesia and newborn respiratory distress. *Seminars in Perinatology* 2006;30:335-40.
84. Coren ME, Meeks M, Morrison I, Buchdahl RM, Bush A. Primary ciliary dyskinesia: age at diagnosis and symptom history. *Acta Paediatr* 2002;91:667-9.
85. Knowles MR, Zariwala M, Leigh M. Primary Ciliary Dyskinesia. *Clin Chest Med* 2016;37:449-61.
86. Polineni D, Davis SD, Dell SD. Treatment recommendations in Primary Ciliary Dyskinesia. *Paediatr Respir Rev* 2016;18:39-45.
87. Strippoli MP, Frischer T, Barbato A, et al. Management of primary ciliary dyskinesia in European children: recommendations and clinical practice. *The European respiratory journal* 2012;39:1482-91.
88. Afzelius BA, Eliasson R. Male and female infertility problems in the immotile-cilia syndrome. *Eur J Respir Dis Suppl* 1983;127:144-7.
89. Halbert SA, Patton DL, Zarutskie PW, Soules MR. Function and structure of cilia in the fallopian tube of an infertile woman with Kartagener's syndrome. *Hum Reprod* 1997;12:55-8.
90. Blyth M, Wellesley D. Ectopic pregnancy in primary ciliary dyskinesia. *J Obstet Gynaecol* 2008;28:358.
91. Zariwala MA, Knowles MR, Leigh MW. Primary Ciliary Dyskinesia. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al., eds. *GeneReviews(R)*. Seattle (WA)1993.
92. Angulo Cuesta J, Unda Urzaiz M, Larrinaga Izaguirre JR, Zubiaur Libano C, Perez Fernandez A, Flores Corral N. [The immotile cilia syndrome as a cause of sterility]. *Arch Esp Urol* 1990;43:773-7.

93. Lucas JS, Barbato A, Collins SA, et al. European Respiratory Society guidelines for the diagnosis of primary ciliary dyskinesia. *Eur Respir J* 2016.
94. Jackson CL, Behan L, Collins SA, et al. Accuracy of diagnostic testing in primary ciliary dyskinesia. *Eur Respir J* 2016;47:837-48.
95. (GGV) VüG. Liste der Geburtsgebrechen <https://www.admin.ch/opc/de/classified-compilation/19850317/index.html>. 2016.
96. Collins SA, Gove K, Walker W, Lucas JS. Nasal nitric oxide screening for primary ciliary dyskinesia: systematic review and meta-analysis. *The European respiratory journal* 2014;44:1589-99.
97. Manna A, Montella S, Maniscalco M, Maglione M, Santamaria F. Clinical application of nasal nitric oxide measurement in pediatric airway diseases. *Pediatr Pulmonol* 2014.
98. Lundberg JO, Weitzberg E, Nordvall SL, Kuylenstierna R, Lundberg JM, Alving K. Primarily nasal origin of exhaled nitric oxide and absence in Kartagener's syndrome. *The European respiratory journal* 1994;7:1501-4.
99. Runer T, Cervin A, Lindberg S, Uddman R. Nitric oxide is a regulator of mucociliary activity in the upper respiratory tract. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1998;119:278-87.
100. Gustafsson LE, Leone AM, Persson MG, Wiklund NP, Moncada S. Endogenous nitric oxide is present in the exhaled air of rabbits, guinea pigs and humans. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;181:852-7.
101. Walker WT, Jackson CL, Lackie PM, Hogg C, Lucas JS. Nitric oxide in primary ciliary dyskinesia. *European Respiratory Journal* 2012.
102. Corbelli R, Bringolf-Isler B, Amacher A, Sasse B, Spycher M, Hammer J. Nasal nitric oxide measurements to screen children for primary ciliary dyskinesia. *Chest* 2004;126:1054-9.
103. Collins SA, Behan L, Harris A, Gove K, Lucas JS. The dangers of widespread nitric oxide screening for primary ciliary dyskinesia. *Thorax* 2016;71:560-1.
104. Boon M, Meyts I, Proesmans M, Vermeulen FL, Jorissen M, De Boeck K. Diagnostic accuracy of nitric oxide measurements to detect primary ciliary dyskinesia. *Eur J Clin Invest* 2014;44:477-85.
105. Stanley P, MacWilliam L, Greenstone M, Mackay I, Cole P. Efficacy of a saccharin test for screening to detect abnormal mucociliary clearance. *Br J Dis Chest* 1984;78:62-5.
106. Ehouman A, Pinchon MC, Escudier E, Bernaudin JF. Ultrastructural abnormalities of respiratory cilia. Descriptive and quantitative study of respiratory mucosa in a series of 33 patients. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1985;48:87-95.

107. Fischer L, Burri PH, Bauer W, Kraemer R, Sauter K. [How useful is the ultrastructural study of the cilia of the respiratory tract in the diagnosis of an immotile cilia syndrome?]. *Schweiz Med Wochenschr* 1984;114:610-9.
108. Meeks M, Bush A. Primary ciliary dyskinesia (PCD). *Pediatr Pulmonol* 2000;29:307-16.
109. Simoneau T, Zandieh SO, Rao DR, et al. Impact of cilia ultrastructural examination on the diagnosis of primary ciliary dyskinesia. *Pediatric and developmental pathology : the official journal of the Society for Pediatric Pathology and the Paediatric Pathology Society* 2013.
110. Shoemark A, Dixon M, Corrin B, Dewar A. Twenty-year review of quantitative transmission electron microscopy for the diagnosis of primary ciliary dyskinesia. *Journal of Clinical Pathology* 2012;65:267-71.
111. Boon M, Smits A, Cuppens H, et al. Primary ciliary dyskinesia: critical evaluation of clinical symptoms and diagnosis in patients with normal and abnormal ultrastructure. *Orphanet J Rare Dis* 2014;9:11.
112. Rutland J, Cox T, Dewar A, Cole P. Screening for ciliary dyskinesia - a spectrum of defects of motility and structure. *Eur J Respir Dis Suppl* 1983;127:71-7.
113. Escudier E, Duquesnoy P, Papon JF, Amselem S. Ciliary defects and genetics of primary ciliary dyskinesia. *Paediatric respiratory reviews* 2009;10:51-4.
114. Nicastro D. Cryo-electron microscope tomography to study axonemal organization. *Methods in Cell Biology* 2009;91:1-39.
115. Papon JF, Coste A, Roudot-Thoraval F, et al. A 20-year experience of electron microscopy in the diagnosis of primary ciliary dyskinesia. *European Respiratory Journal* 2010;35:1057-63.
116. Nuesslein T, Brinkmann F, Ahrens P, et al. Diagnostik der primären ziliären Dyskinesie. *Monatsschr Kinderheilkd* 2013;161:406-16.
117. O'Callaghan C, Rutman A, Williams GM, Hirst RA. Inner dynein arm defects causing Primary Ciliary Dyskinesia: Repeat testing required. *European Respiratory Journal* 2011.
118. Sturgess JM, Chao J, Turner JA. Transposition of ciliary microtubules: another cause of impaired ciliary motility. *New England Journal of Medicine* 1980;303:318-22.
119. Sturgess JM, Chao J, Wong J, Aspin N, Turner JA. Cilia with defective radial spokes: a cause of human respiratory disease. *New England Journal of Medicine* 1979;300:53-6.
120. Stannard W, Rutman A, Wallis C, O'Callaghan C. Central microtubular agenesis causing primary ciliary dyskinesia. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2004;169:634-7.

121. Knowles MR, Ostrowski LE, Leigh MW, et al. Mutations in RSPH1 cause primary ciliary dyskinesia with a unique clinical and ciliary phenotype. *Am J Respir Crit Care Med* 2014;189:707-17.
122. Pifferi M, Cangiotti AM, Ragazzo V, Baldini G, Cinti S, Boner AL. Primary ciliary dyskinesia: diagnosis in children with inconclusive ultrastructural evaluation. *Pediatr Allergy Immunol* 2001;12:274-82.
123. Gotz M, Stockinger L. Aplasia of respiratory tract cilia. *Lancet* 1983;1:1283.
124. DeBoeck K, Jorissen M, Wouters K, et al. Aplasia of respiratory tract cilia. *Pediatr Pulmonol* 1992;13:259-65.
125. Boon M, Wallmeier J, Ma L, et al. MCIDAS mutations result in a mucociliary clearance disorder with reduced generation of multiple motile cilia. *Nat Commun* 2014;5:4418.
126. Clary-Meinesz C, Mouroux J, Huitorel P, Cosson J, Schoevaert D, Blaive B. Ciliary beat frequency in human bronchi and bronchioles. *Chest* 1997;111:692-7.
127. Veale D, Rodgers AD, Griffiths CJ, Ashcroft T, Gibson GJ. Variability in ciliary beat frequency in normal subjects and in patients with bronchiectasis. *Thorax* 1993;48:1018-20.
128. Christopher AB, Ochoa S, Krushansky E, et al. The effects of temperature and anesthetic agents on ciliary function in murine respiratory epithelia. *Front Pediatr* 2014;2:111.
129. Chilvers MA, Rutman A, O'Callaghan C. Ciliary beat pattern is associated with specific ultrastructural defects in primary ciliary dyskinesia. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112:518-24.
130. Horani A, Ferkol TW, Dutcher SK, Brody SL. Genetics and biology of primary ciliary dyskinesia. *Paediatr Respir Rev* 2016;18:18-24.
131. Marshall CR, Scherer SW, Zariwala MA, et al. Whole-Exome Sequencing and Targeted Copy Number Analysis in Primary Ciliary Dyskinesia. *G3 (Bethesda)* 2015;5:1775-81.
132. Knowles MR, Leigh MW, Ostrowski LE, et al. Exome sequencing identifies mutations in *CCDC114* as a cause of primary ciliary dyskinesia. *Am J Hum Genet* 2013;92:99-106.
133. Onoufriadis A, Shoemark A, Munye MM, et al. Combined exome and whole-genome sequencing identifies mutations in *ARMC4* as a cause of primary ciliary dyskinesia with defects in the outer dynein arm. *J Med Genet* 2014;51:61-7.
134. Olbrich H, Cremers C, Loges NT, et al. Loss-of-Function *GAS8* Mutations Cause Primary Ciliary Dyskinesia and Disrupt the Nexin-Dynein Regulatory Complex. *Am J Hum Genet* 2015;97:546-54.

135. Fliegau M, Olbrich H, Horvath J, et al. Mislocalization of DNAH5 and DNAH9 in respiratory cells from patients with primary ciliary dyskinesia. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2005;171:1343-9.
136. Frommer A, Hjej R, Loges NT, et al. Immunofluorescence Analysis and Diagnosis of Primary Ciliary Dyskinesia with Radial Spoke Defects. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2015;53:563-73.
137. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 2012;9:671-5.
138. Bertrand B, Collet S, Eloy P, Rombaux P. Secondary ciliary dyskinesia in upper respiratory tract. *Acta Otorhinolaryngol Belg* 2000;54:309-16.
139. Collins SA, Walker WT, Lucas JS. Genetic Testing in the Diagnosis of Primary Ciliary Dyskinesia: State-of-the-Art and Future Perspectives. *J Clin Med* 2014;3:491-503.
140. Choksi SP, Babu D, Lau D, Yu X, Roy S. Systematic discovery of novel ciliary genes through functional genomics in the zebrafish. *Development* 2014;141:3410-9.
141. Goutaki M, Meier AB, Halbeisen FS, et al. Clinical manifestations in primary ciliary dyskinesia: systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J* 2016;48:1081-95.
142. Daniels ML, Noone PG. Genetics, diagnosis, and future treatment strategies for primary ciliary dyskinesia. *Expert Opin Orphan Drugs* 2015;3:31-44.
143. Leigh MW, O'Callaghan C, Knowles MR. The challenges of diagnosing primary ciliary dyskinesia. *Proc Am Thorac Soc* 2011;8:434-7.
144. Sleight MA. Ciliary function in mucus transport. *Chest* 1981;80:791-5.
145. Puchelle E, Zahm JM, Quemada D. Rheological properties controlling mucociliary frequency and respiratory mucus transport. *Biorheology* 1987;24:557-63.
146. Liu L, Shastry S, Byan-Parker S, et al. An autoregulatory mechanism governing mucociliary transport is sensitive to mucus load. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2014;51:485-93.
147. Gerber V, Gehr P, Straub R, Frenz M, King M, Im Hof V. Mucus quality on horse tracheal epithelium: microscopic grading based on transparency. *Respir Physiol* 1997;107:67-74.
148. Eccles R. Understanding the symptoms of the common cold and influenza. *Lancet Infect Dis* 2005;5:718-25.
149. Heikkinen T, Jarvinen A. The common cold. *Lancet* 2003;361:51-9.
150. Liote H, Zahm JM, Pierrot D, Puchelle E. Role of mucus and cilia in nasal mucociliary clearance in healthy subjects. *Am Rev Respir Dis* 1989;140:132-6.

151. Puchelle E, Zahm JM. Influence of rheological properties of human bronchial secretions on the ciliary beat frequency. *Biorheology* 1984;21:265-72.
152. Sackner MA. Mucociliary transport. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1978;87:474-83.
153. Roth Y, Aharonson EF, Teichtahl H, Baum GL, Priel Z, Modan M. Human in vitro nasal and tracheal ciliary beat frequencies: comparison of sampling sites, combined effect of medication, and demographic relationships. *The Annals of otology, rhinology, and laryngology* 1991;100:378-84.
154. Rutland J, Griffin W, Cole PJ. An in vitro model for studying the effects of pharmacological agents on human ciliary beat frequency: effects of lignocaine. *Br J Clin Pharmacol* 1982;13:679-83.
155. Rutland J, Griffin W, Cole P. Nasal brushing and measurement of ciliary beat frequency. An in vitro method for evaluating pharmacologic effects on human cilia. *Chest* 1981;80:865-7.
156. Armengot M, Basterra J, Garcia-Bartual E. The influence of anesthetics and vasoconstrictors on nasal mucociliary transport. *Acta Otorhinolaryngol Belg* 1989;43:149-56.
157. Robson AM, Smallman LA, Drake-Lee AB. Factors affecting ciliary function in vitro: a preliminary study. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 1992;17:125-9.
158. Mostow SR, Dreisin RB, Manawadu BR, LaForce FM. Adverse effects of lidocaine and methylparaben on tracheal ciliary activity. *Laryngoscope* 1979;89:1697-701.
159. Tontschev G, Dexheimer A. [Effect of local anesthetics on ciliary activity of the human tracheobronchial mucosa (studies in vitro)]. *Z Erkr Atmungsorgane* 1986;166:175-9.
160. Verra F, Escudier E, Pinchon MC, Fleury J, Bignon J, Bernaudin JF. Effects of local anaesthetics (lidocaine) on the structure and function of ciliated respiratory epithelial cells. *Biol Cell* 1990;69:99-105.
161. Ingels KJ, Nijziel MR, Graamans K, Huizing EH. Influence of cocaine and lidocaine on human nasal cilia. Beat frequency and harmony in vitro. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1994;120:197-201.
162. Robertson A, Stannard W, Passant C, O'Callaghan C, Banerjee A. What effect does isoflurane have upon ciliary beat pattern: an in vivo study. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 2004;29:157-60.
163. Lee KS, Park SS. Effect of halothane, enflurane, and nitrous oxide on tracheal ciliary activity in vitro. *Anesth Analg* 1980;59:426-30.

164. Hirst RA, Jackson CL, Coles JL, et al. Culture of primary ciliary dyskinesia epithelial cells at air-liquid interface can alter ciliary phenotype but remains a robust and informative diagnostic aid. *PLoS One* 2014;9:e89675.
165. Jorissen M, Willems T, De Boeck K. Diagnostic evaluation of mucociliary transport: from symptoms to coordinated ciliary activity after ciliogenesis in culture. *Am J Rhinol* 2000;14:345-52.
166. Sommer JU, Gross S, Hormann K, Stuck BA. Time-dependent changes in nasal ciliary beat frequency. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2010;267:1383-7.
167. Ingels KJ, Kortmann MJ, Nijziel MR, Graamans K, Huizing EH. Factors influencing ciliary beat measurements. *Rhinology* 1991;29:17-26.
168. Gamarra F, Bergner A, Stauss E, Stocker I, Grundler S, Huber RM. Rotation frequency of human bronchial and nasal epithelial spheroids as an indicator of mucociliary function. *Respiration* 2006;73:664-72.
169. Jackson CL, Goggin PM, Lucas JS. Ciliary beat pattern analysis below 37 degrees C may increase risk of primary ciliary dyskinesia misdiagnosis. *Chest* 2012;142:543-4; author reply 4-5.
170. Smith CM, Hirst RA, Bankart MJ, et al. Cooling of cilia allows functional analysis of the beat pattern for diagnostic testing. *Chest* 2011;140:186-90.
171. Liener K, Leiacker R, Lindemann J, Rettinger G, Keck T. Nasal mucosal temperature after exposure to cold, dry air and hot, humid air. *Acta Otolaryngol* 2003;123:851-6.
172. Lindemann J, Leiacker R, Rettinger G, Keck T. Nasal mucosal temperature during respiration. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 2002;27:135-9.
173. Clary-Meinesz C, Mouroux J, Cosson J, Huitorel P, Blaive B. Influence of external pH on ciliary beat frequency in human bronchi and bronchioles. *The European respiratory journal* 1998;11:330-3.
174. Lindemann CB, Lesich KA. Flagellar and ciliary beating: the proven and the possible. *J Cell Sci* 2010;123:519-28.
175. Osterman N, Vilfan A. Finding the ciliary beating pattern with optimal efficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011;108:15727-32.
176. Bermbach S, Weinhold K, Roeder T, et al. Mechanisms of cilia-driven transport in the airways in the absence of mucus. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2014;51:56-67.
177. Lauga E, Powers TR. The hydrodynamics of swimming microorganisms. *Rep Prog Phys* 2009;72.

178. Thomas B, Rutman A, O'Callaghan C. Disrupted ciliated epithelium shows slower ciliary beat frequency and increased dyskinesia. *The European respiratory journal* 2009;34:401-4.
179. Papon JF, Bassinet L, Cariou-Patron G, et al. Quantitative analysis of ciliary beating in primary ciliary dyskinesia: a pilot study. *Orphanet J Rare Dis* 2012;7:78.
180. Quinn SP, Zahid MJ, Durkin JR, Francis RJ, Lo CW, Chennubhotla SC. Automated identification of abnormal respiratory ciliary motion in nasal biopsies. *Sci Transl Med* 2015;7:299ra124.
181. Nyquist H. Certain Topics in Telegraph Transmission Theory. *Transactions of the American Institute of Electrical Engineers* 1928;47:617-44.
182. Sisson JH, Stoner JA, Ammons BA, Wyatt TA. All-digital image capture and whole-field analysis of ciliary beat frequency. *J Microsc* 2003;211:103-11.