

Aus dem Bereich
Theoretische Medizin und Biowissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg

**Der murine TRPM5-Kanal und die Entzündung der unteren Atemwege
nach Bürstenzellstimulation.**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Humanmedizin
der medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES**

2022

vorgelegt von Clara Eileen Englisch
geboren am 24.03.2000 in Bogen

Institut für Anatomie, Zellbiologie und Entwicklungsbiologie
Universität des Saarlandes, Homburg
Univ.-Prof. Dr. Gabriela Krasteva-Christ

Tag der Promotion: 26.07.2022

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Michael D. Menger

Berichterstatter: Prof. Dr. Gabriela Krasteva-Christ

Prof Dr. David Mick

meiner Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG.....	1
SUMMARY.....	3
1. EINLEITUNG.....	5
1.1 Lunge und Atemwege.....	5
• 1.1.1 Die Embryologie und Anatomie des Respirationstraktes.....	5
• 1.1.2 Physiologie der Lunge.....	5
• 1.1.4 Das Nervensystem der Atemwege.....	6
1.2 Die Pneumonie – ein aktuelles und relevantes Thema	7
• 1.2.1 Definition, Systematik und Erreger.....	7
• 1.2.2 Pathologie.....	7
• 1.2.3 Die bakterielle Infektion	8
• 1.2.4 Problematiken und neue Lösungsansätze.....	8
1.3 Die Bürstenzelle	9
• 1.3.1 Ein besonderer Sinn: der Geschmack.....	9
• 1.3.2 Die solitäre chemosensorische Zelle in der Nase.....	11
• 1.3.3 Die tracheale Bürstenzelle.....	13
1.4 Die Entzündungsreaktion: ein komplexer Prozess	18
• 1.4.1 Auslösung einer Entzündungsreaktion.....	19
• 1.4.2 Die akute Entzündungsreaktion	19
• 1.4.4 Entzündungsmediatoren	24
• 1.4.8 Die neurogene Entzündung	25
1.5 Denatonium als Induktor in einem Modell der neurogenen Entzündung	26
1.6 Fragestellung.....	27
2. MATERIAL UND METHODIK	29
2.1 Chemikalien und Reagenzien	29
2.2 Lösungen und Puffer	30
2.3 Antikörper.....	31

• 2.3.1 Primäre Antikörper.....	31
• 2.3.2 Sekundäre Antikörper	32
2.4 Laborbedarf und Geräte.....	33
• 2.4.1 Laborbedarf	33
• 2.4.2 Geräte	34
2.5 Veterinärmedizinischer Bedarf	35
2.6 Tiere.....	35
2.7 Versuchsgruppen und Operation der Mäuse.....	36
2.8 Gewebegewinnung.....	37
• 2.8.1 Perfusion und Präparation der Organe	37
• 2.8.2 Präparation	38
2.9 Behandlung der Gewebe	39
• 2.9.1 Waschen	39
• 2.9.2 Einbetten	39
2.10 Herstellung von Kryoschnitten.....	40
2.11 Immunhistochemie	40
2.12 Auswertung	42
• 2.12.1 Trachea-Schnitte	42
• 2.12.2 Lungen-Schnitte	42
2.13 Statistik.....	44
3. ERGEBNISSE.....	46
3.1 Zahl der Bürstenzellen in der Trachea.....	46
• 3.1.1 Vergleich der TRPM5 ^{+/+} - und TRPM5 ^{-/-} -Tiere	47
• 3.1.2 Zeitlicher Verlauf bei TRPM5 ^{+/+} -Tieren	49
• 3.1.3 Zeitlicher Verlauf bei TRPM5 ^{-/-} -Tieren	49
3.2 Zahl der neutrophilen Granulozyten in der Trachea.....	49
• 3.2.1 Immunhistochemische Darstellung der neutrophilen Granulozyten	49
• 3.2.2 Vergleich der TRPM5 ^{+/+} - und TRPM5 ^{-/-} -Tiere	50
• 3.2.3 Zeitlicher Verlauf bei TRPM5 ^{+/+} -Tieren	52

• 3.2.4 Zeitlicher Verlauf bei TRPM5 ^{-/-} -Tieren	52
3.3 Zahl der dendritischen Zellen in der Trachea	53
• 3.3.1 Immunhistochemische Darstellung der dendritischen Zellen	53
• 3.3.1 Vergleich der TRPM5 ^{+/+} - und TRPM5 ^{-/-} -Tiere	55
• 3.3.2 Zeitlicher Verlauf bei TRPM5 ^{+/+} -Tieren	56
• 3.3.3 Zeitlicher Verlauf bei TRPM5 ^{-/-} -Tieren	57
3.4 Weitere Immunzellen in der Trachea: Makrophagen und B-Lymphozyten.....	57
• 3.4.2 B-Lymphozyten in der Trachea.....	57
• 3.4.3 Makrophagen in der Trachea.....	58
3.5 Der Komplementsystembestandteils C3 in der Trachea	58
3.6 Prüfung der Ergebnisse auf Korrelationen	60
• 3.6.1 Zusammenhang zwischen Bürstenzellen und neutrophilen Granulozyten.....	60
• 3.6.2 Zusammenhang zwischen der Anzahl an Bürstenzellen und der Zahl an dendritischen Zellen	60
3.7 Neutrophile in der Lunge.....	62
• 3.7.1 Immunhistochemische Darstellung der neutrophilen Granulozyten in der Lunge.....	62
• 3.7.2 Vergleich der TRPM5 ^{+/+} - und TRPM5 ^{-/-} -Tiere	64
• 3.7.3 Auswirkung der Vehikelinhalation auf die Anzahl an neutrophilen Granulozyten in der Lunge	64
• 3.7.4 Zeitlicher Verlauf bei TRPM5 ^{+/+} -Tieren und TRPM5 ^{-/-} -Tieren	65
• 3.7.5 Granula um neutrophile Granulozyten herum.....	66
• 3.7.6 Neutrophile Granulozyten im Bereich der Hauptbronchien.....	68
3.8 B-Lymphozyten in der Lunge.....	68
• 3.8.1 Immunhistochemische Darstellung der B-Lymphozyten in der Lunge	68
• 3.8.2 Vergleich der TRPM5 ^{+/+} - und TRPM5 ^{-/-} -Tiere	70
• 3.8.3 Auswirkung der Vehikelinhalation auf die B-Lymphozytenzahlen in der Lunge	70
• 3.8.4 Zeitlicher Verlauf bei TRPM5 ^{+/+} -Tieren und TRPM5 ^{-/-} -Tieren	71
3.9 T-Lymphozyten in der Lunge.....	72
• 3.9.1 Immunhistochemische Darstellung der T-Lymphozyten in der Lunge.....	72
• 3.9.2 Auswirkung der Vehikelinhalation auf die T-Lymphozytenzahlen in der Lunge.....	74
• 3.9.3 Vergleich der TRPM5 ^{+/+} - und TRPM5 ^{-/-} -Tiere	74
• 3.9.4 Zeitlicher Verlauf bei TRPM5 ^{+/+} -Tieren und TRPM5 ^{-/-} -Tieren	75

3.10 Makrophagen in der Lunge	76
4. DISKUSSION	79
4.1 Die immunregulatorische Rolle der Bürstenzelle und des TRPM5-Kanals	79
• 4.1.1 Die Bedeutung der Pneumonie.....	79
• 4.1.2 Die immunologische Funktion der Bürstenzelle	79
• 4.1.3 Eine hohe interindividuelle Variabilität bei den TRPM5 ^{-/-} -Tieren.....	80
• 4.1.4 B-Lymphozyten: eine Sonderstellung?	81
4.2 Die Wirkung von Denatonium auf die Entzündungsaktivität der unteren Atemwege über 7 Tage hinweg.....	83
• 4.2.1 Methodenkritik.....	83
• 4.2.2 Das „3-Tages-Tief“	84
• 4.2.3 Die Rolle der dendritischen Zellen im Rahmen der neurogenen Entzündung	86
• 4.2.4 Weitere Merkmale der Denatonium-induzierten Entzündung der Atemwege	87
• 4.2.5 Status am Ende des siebentägigen Beobachtungszeitraums.....	88
• 4.2.6 Die Rolle der T-Lymphozyten	89
• 4.2.7 Makrophagen in der neurogenen Entzündung.....	90
4.3 Die Wirkung von Denatonium auf die Bürstenzellen der Trachea	91
• 4.3.1 Bürstenzellen als Sensoren für Denatonium - ihre Charakteristika.....	91
• 4.3.2 Expansion der Bürstenzellen bei den TRPM5 ^{+/+} -Tieren	92
• 4.3.3 Ausblick: eine klinische Anwendung?.....	94
BIBLIOGRAPHIE	96
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	111
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	113
TABELLENVERZEICHNIS	114
ANHANG	115
DANKSAGUNG.....	118
LEBENS LAUF	119

Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der längerfristigen Beobachtung der Entzündungsreaktion in den unteren Atemwegen der Maus nach Stimulation der trachealen Bürstenzellen mit Denatonium. Der TRPM5-Kanal ist als Kationenkanal an der Signalkaskade der trachealen chemosensorischen Bürstenzelle beteiligt, von welcher zunehmend immunologische Funktionen bekannt werden. Durch Aktivierung der Bittersignalkaskade kommt es zum Kationeneinstrom durch den TRPM5-Kanal in die Bürstenzelle, wodurch es zur Depolarisation und Ausschüttung von Acetylcholin kommt. Das Acetylcholin führt über nikotinische Acetylcholinrezeptoren an Neuronen zur neuronalen Freisetzung von Substanz P und CGRP. Es werden Immunzellen rekrutiert. Bis dato wurde diese Form der Entzündung in der Trachea nach Denatoniuminhalation nur 30 min nach der Inhalation untersucht. Die vorliegende Arbeit hatte als Zielsetzung, die Form dieser Entzündungsreaktion über 7 Tage hinweg zu dokumentieren und die Rolle des TRPM5-Kanals weiter zu erforschen. Ebenfalls sollte das Verhalten der Bürstenzellen über diesen längeren Zeitraum beobachtet werden.

Die tierexperimentellen Versuche fanden an TRPM5^{+/+}- und TRPM5^{-/-}-Mäusen statt. Hierzu wurden für jeden Mausstamm 5 Versuchsgruppen erstellt: jeweils eine reine Kontrollgruppe mit keinerlei Eingriff, eine Gruppe mit Inhalation der Pufferlösung und Tötung nach 1 Tag, eine Gruppe mit Inhalation von 1 mM Denatonium und Tötung nach 1 Tag, sowie nach 3 Tagen und 7 Tagen. Die beiden erstgenannten Gruppen dienten als Kontrollgruppen. Das Denatonium wurde in einem Phosphatpuffer gelöst und durch das Ligamentum conicum in den kranialen Abschnitt der Trachea injiziert. Je nach Gruppe erfolgte dann die Perfusion der Tiere am entsprechenden postoperativem Tag. Lungen und Trachea wurden histologisch aufgearbeitet und immunhistochemisch gefärbt, um mittels Fluoreszenzmikroskopie die Zellen darstellen, lokalisieren und quantifizieren zu können.

Anhand dieser Methodik konnten wir eine TRPM5-abhängige Expansion der Bürstenzellen mit einem Maximum am 3. Tag nach Inhalation feststellen. Die Zahl der Bürstenzellen wies eine positive lineare Korrelation mit der Anzahl an dendritischen Zellen in der Trachea auf. Diese Korrelation könnte als synergistische Stärkung der Immunkompetenz bei den Wildtypen gedeutet werden. Besagte Immunkompetenz zeigte sich bei den Wildtypen stärker als bei den TRPM5^{-/-}-Tieren, im Sinne einer Einbindung des Komplementsystems und einer Steigerung der Abwehrkraft der Lunge nach sieben Tagen (Neutrophile als «first responder»). Auch der unerwartete Anstieg der T-Lymphozyten und die hohe interindividuelle Variabilität der Neutrophilen bei den TRPM5^{-/-}-Tieren (und ihre überschießende Rekrutierung in die Trachea nach einem und sieben Tagen) spricht für ein dysreguliertes Immunsystem. All diese Ergebnisse lassen zusammenfassend auf eine immunregulatorische Funktion des TRPM5-Kanals und somit der Bürstenzellen schließen.

Die Frage ob Denatonium eines Tages als Pharmakon zur Therapie oder Prophylaxe von Pneumonien genutzt werden könnte, kann mit den vorliegenden Ergebnissen nicht endgültig beantwortet werden.

Hierzu ist noch weitere Forschungsarbeit nötig; die hier vorgestellten Ergebnisse schließen eine derartige Anwendung in der Zukunft jedoch nicht aus. Besonders die hier beschriebene immunregulatorische Funktion des TRPM5-Kanals könnte in Zukunft viele Ansätze im Bereich von Autoimmunerkrankungen bieten. Auch in der Prophylaxe von infektiösen oder entzündlichen Erkrankungen mit überschießenden Immunreaktionen, wie SARS-2-Covid-19-Pneumonien, könnten Anwendungsbereiche liegen.

Summary

The aim of the present study was the long-term observation of the inflammatory reaction in the lower respiratory tract of the mouse after denatonium inhalation via the trachea. The TRPM5 channel is involved as a cation channel in the signalling cascade of the tracheal chemosensory brush cell, of which increasing immunological functions are known. Activation of the bitter signalling cascade leads to cation influx through the TRPM5 channel into the brush cell, resulting in depolarisation and the release of acetylcholine. Acetylcholine leads via nicotinic acetylcholine receptors to the neuronal release of substance P and CGRP. In consequence different types of immune cells are recruited. Until now, this form of inflammation in the trachea after denatonium inhalation has been investigated only for a 30 min period. The aim of this study was to document the nature of this inflammatory reaction over 7 days and to further investigate the role of the TRPM5 channel. The behaviour of the brush cells has also been observed over this longer period.

The experiments were performed with TRPM5^{+/+} and TRPM5^{-/-} mice. Five experimental groups were created for each genotype: one group without any intervention, one group with injection of buffer solution and killing after 1 day, one group with injection of 1mM denatonium and killing after 1 day, one group with killing after 3 days and another after 7 days. The first two groups were used as control groups. Denatonium was dissolved in a phosphate buffer and injected through the Ligamentum conicum into the cranial section of the trachea. Depending on the group, the animals were then perfused on the corresponding postoperative day. Lungs and trachea were histologically processed and immunohistochemically stained in order to visualize and quantify the cells by fluorescence microscopy.

Using this methodology, we could determine a TRPM5-dependent expansion of the brush cells with a maximum on the 3rd day after inhalation. The number of brush cells showed a positive linear correlation with the number of dendritic cells in the trachea. This correlation could be interpreted as a synergistic strengthening of immunocompetence in wildtypes. This immunocompetence was stronger in the wildtypes than in the TRPM5^{-/-}-animals, in the sense of an activation of the complement system and an increase of the lung's defensive power after seven days (neutrophils as "first responder"). The unexpected increase in T-lymphocytes and the high inter-individual variability of neutrophils in the TRPM5^{-/-}-animals (and their excessive recruitment into the trachea after one and seven days) also speaks for a dysregulated immune system. All these results together suggest an immunoregulatory function of the TRPM5 channel and thus of the brush cells.

The question if denatonium could one day be used as a pharmaceutical for the therapy or prophylaxis of pneumonia cannot be answered finally with the present results. Much more further research work is required for this; however, the results presented here do not rule out such an application in the future. Especially the immunoregulatory function of the TRPM5 channel described here could offer many approaches in the field of autoimmune diseases. The prophylaxis of infectious or inflammatory

diseases with excessive immune reactions, such as SARS-2-Covid-19 pneumonia, could also be a field of application.

1. Einleitung

1.1 Lunge und Atemwege

1.1.1 Die Embryologie und Anatomie des Respirationstraktes

Die erste Anlage des humanen Respirationstraktes ist die Laryngotrachealrinne, welche eine Abspaltung am Vorderdarm darstellt und sich ab der 3. Entwicklungswoche bildet. Am kaudalen Ende der Laryngotrachealrinne bildet sich eine paarige Lungenanlage in Form von zwei Lungenknospen (Schiebler TH et Korf H-W 2007). Des Weiteren unterscheidet man in der Entwicklung der Lunge 3 Stadien: das embryonale Stadium, gefolgt vom fetalen Stadium, und letztlich das postnatale Stadium. Diese Stadien können weiterhin nach den physiologischen Prozessen logisch gegliedert werden (pseudoglanduläre, kanalikuläre und sacculäre Phase); hierbei ist zu vermerken, dass sich die Stadien von Maus zu Mensch nicht wesentlich unterscheiden, alleine die zeitliche Situierung in der Reifung des Embryos ist verschieden, was angesichts der gesamten Entwicklungsdauer von menschlichem und murinem Embryo nicht verwundert (Schittny 2017).

Bezüglich der Anatomie haben Mäuse und Menschen eine ähnliche, aber variable Anzahl an U-förmigen, nach dorsal offenen Knorpelringen, welche die Trachea bilden (15-18 bei Mäusen und 15-20 beim Menschen). Nach dorsal wird die Trachea durch eine fibromuskuläre Membran verschlossen. Das tracheale Epithel von Mäusen ist dünner als das von Menschen und hat auch eine abweichende zelluläre Zusammensetzung. Bei der Maus überwiegen die nicht-Zilien-tragenden Zellen, gefolgt von Zilien-tragenden Zellen und letztlich Basalzellen. Beim Menschen überwiegen die Zilien-tragenden Zellen, gefolgt von den Basalzellen und letztlich den nicht-zilien-tragenden Zellen. Dieser Proportionen setzen sich bis in die Bronchien fort. Die Anzahl der Lungenlappen ist verschieden. Die Maus hat vier rechte und einen linken Lungenlappen, während der Mensch bekanntlich drei rechte und zwei linke Lungenlappen hat. Die Aufzweigungen des Bronchialbaums sind interessanterweise ebenfalls unterschiedlich. Der Bronchialbaum der Maus hat ein monopodiales Aufzweigungsmuster, während die Bronchien des Menschen sich dichotom teilen. Ein weiterer Unterschied besteht in dem stark verminderten Vorkommen von respiratorischen Bronchiolen bei der Maus (Treuting PM et al. 2018). Die Atemwege von Mensch und Maus unterscheiden sich also in einigen Punkten. Diese Unterschiede sind in den unteren Atemwegen aber weniger ausgeprägt als in den oberen Atemwegen.

1.1.2 Physiologie der Lunge

Die Grundlagen der Physiologie der Atmungsorgane dürfen als bekannt vorausgesetzt werden. Hervorgehoben werden sollen nun spezifische Merkmale der Atemwege, welche besonders relevant für die vorliegende Arbeit sind.

Zum einen scheint interessant, dass die basale Zilienschlagfrequenz in Zellkulturen aus der Nase weniger als halb so hoch ist wie die in Trachea-Kulturen (Zhao et al. 2011). Von besonderem Interesse ist zudem die cholinerge Physiologie der Atemwege. Dass nicht-neuronales Acetylcholin (ACh) in humanen Bronchien vorkommt, wurde bereits vor mehr als zwei Jahrzehnten gezeigt (Klapproth et al. 1997). Ein direkter Nachweis von ACh in dem Flüssigkeitsfilm der Atemwege ist inzwischen auch erfolgt (Hollenhorst et al. 2012). Auch das Schlüsselenzym der ACh-Synthese, die Cholin-Acetyl-Transferase (ChAT), konnte in epithelialen Atemwegszellen gefunden werden (Klapproth et al. 1997). Da die ChAT und der vesikuläre ACh-Transporter (VACHT) den selben Genlocus haben, ist es möglich, dass das Vorkommen des VACHT in den Atemwegen funktionell unwichtig ist (Proskocil et al. 2004). Das ACh-abbauende Enzym, die Acetylcholinesterase, kommt hingegen nur sehr wenig in den Atemwegen vor (Kummer et al. 2008), was zu längeren und verstärkten Wirkungen von ACh führen kann. In den Atemwegen finden sich alle drei Typen von muscarinischen ACh-Rezeptoren. Unter physiologischen Bedingungen wird die Kontraktion der glatten Muskulatur wesentlich durch M3R (G_q-gekoppelt) vermittelt (über die PLC, IP3 und einen Ca-Anstieg), während M2R (G_i-gekoppelt) einen negativen Feedbackloop unterhalten: M2R hemmen präsynaptisch die ACh-Ausschüttung (Meurs et al. 2013).

1.1.4 Das Nervensystem der Atemwege

Die Atemwege werden sensorisch innerviert. Die Zellkörper der sensorischen Neurone befinden sich in den sensorischen vagalen Ganglien, sowie in den „DRGs“ (dorsal root ganglia, Spinalganglion). Es werden im wesentlichen A- und C-Fasern unterschieden. A-Fasern sind myelinisierte, nicht-peptiderge Mechanorezeptoren («messen» den Dehnungszustand der Lunge) mit einer Leitungsgeschwindigkeit von ca. 14-32 m/s. Ihre Nervenendigungen sind mit glatten Muskelzellen und neuroepithelialen Körperchen assoziiert. Es gibt unter den A-Fasern auch sogenannte „Hustenrezeptoren“ (4-6 m/s), welche nicht durch Dehnung aktiviert werden und sich in extrapulmonalen Atemwegen befinden. Diese schnell adaptierenden Dehnungsrezeptoren werden durch einige andere Stimuli bei Entzündung aktiviert (Leukotriene, Thromboxane, Histamin, Neurokinine). C-Fasern sind langsam-leitende, unmyelinisierte Neurone welche durch physikalisch, chemische und thermische Stimuli aktiviert werden können. Ein Teil der C-Fasern exprimiert Substanz P und CGRP. Die Freisetzung von Neuropeptiden nach Stimulation der peripheren Nervenenden führt zur neurogenen Entzündung, wie sie weiter unten ausführlich beschrieben wird (Audrit et al. 2017; Brandes R et al. 2019; Trepel M et Dalkowski K 2017).

Außerdem werden die Atemwege auch sympathisch und parasympathisch innerviert. Die sympathischen Fasern zur Innervation der Trachea stammen im Wesentlichen aus dem Ganglion cervicale superius und dem Ganglion stellatum (Kummer et al. 1992; McGovern et al. 2012). Die parasympathischen Fasern stammen v.a. aus dem Nucleus ambiguus im Hirnstamm (McGovern et Mazzone 2014). Postganglionär unterscheidet man mindestens zwei Arten von parasympathischer

Innervation: zum einen die dem trachealen Gewebe intrinsische Innervation und zum anderen Projektionen der ösophagealen nicht-cholinergen parasymphatischen Innervation. Letztere vermitteln, im Gegensatz zur cholinergen Innervation (Kistemaker et Gosens 2015), eine Relaxation der glatten Muskulatur der Atemwege mittels VIP und NO-Freisetzung (Fischer et al. 1998).

1.2 Die Pneumonie – ein aktuelles und relevantes Thema

1.2.1 Definition, Systematik und Erreger

Definiert wird die Pneumonie als eine Entzündung des Lungenparenchyms, welche akut oder chronisch verlaufen kann, und typischerweise mit Symptomen wie Husten, Auswurf und Fieber einhergeht. Eine Pneumonie kann jedoch auch mit anderen oder geringer ausgeprägten Symptomen verlaufen, dann gilt sie als klinisch atypische Pneumonie (Pschyrembel W 2017). Es gibt mehrere Möglichkeiten Pneumonien zu klassifizieren. Die gebräuchlichste -und im Rahmen der vorliegenden Arbeit relevanteste - ist die Unterscheidung in „community-acquired pneumonia“ (CAP) und „hospital-acquired pneumonia“ (HAP). Die CAP wird außerhalb des Krankenhauses erworben, während sich die HAP mindestens 48h nach Krankenhausaufnahme manifestiert (Bochud et al. 2001; Lanks et al. 2019). Diese Klassifizierung ist insofern sinnvoll, als dass sie klinisch relevant ist; das Erregerspektrum der beiden Typen ist unterschiedlich und somit auch die Therapie. Demnach ist bei der CAP *Streptococcus pneumoniae* der meist isolierte Erreger (Lanks et al. 2019), es finden sich aber auch *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionellen*, *Chlamydia pneumoniae* sowie respiratorische Viren. Zu den häufigsten Erregern der HAP gehören u.a. Staphylokokken, Pseudomonaden, Klebsiellen, Enterobacter, Legionellen und Acinetobacter; gram-negative Stäbchen-Bakterien sind hier deutlich mehr repräsentiert als bei der CAP (Arastéh K et al. 2018).

1.2.2 Pathologie

Pathologen unterscheiden verschiedene Ausbreitungstypen der Pneumonie. So ist bei der Lobärpneumonie ein Lungenlappen gesondert betroffen (selten auch mehrere), während bei der Herdpneumonie einzelne Lobuli befallen sind, dies aber über mehrere Lungenlappen hinweg. Zwei andere Ausbreitungstypen werden dadurch charakterisiert, dass sie durch eine aerogene Infektion entstehen. Bei der Bronchopneumonie findet aber zudem noch eine endobronchiale Erregerausbreitung statt, während es bei der peribronchialen Herdpneumonie zu keiner endobronchiale Erregerausbreitung kommt, die Erreger aber die Bronchialwand durchdringen und so in das Lungenparenchym eindringen. Weiterhin zu differenzieren ist die interstitielle Pneumonie. Hauptmerkmal der Lobärpneumonie ist eine Verfestigung des Lungenparenchyms eines einzelnen Lungenlappens, während bei der Bronchopneumonie die Verfestigung eher „fleckig“ auftritt. Diese Differenzierungen können im Einzelfall nicht immer klar getroffen werden. Zudem sind die durch einen Erreger ausgelösten Befallsmuster interindividuell unterschiedlich. Klinisch relevant sind

daher prinzipiell der Erregernachweis und die Feststellung der bereits stattgefundenen Ausbreitung (Riede U-N et Werner M 2017; Robbins SL 2018).

1.2.3 Die bakterielle Infektion

Bakterienkolonien können mittels Quorum-Sensing-Molekülen (QSM) intern aber auch untereinander kommunizieren. Quorum sensing ist ein Mechanismus, bei welchem die Gen-Expression der Bakterien in Abhängigkeit von Umweltfaktoren reguliert wird, insbesondere die Bakteriendichte spielt eine Rolle. Die Bakterien einer Kolonie setzen chemische Stoffe frei, welche in der Summe abbilden wie hoch die Bakteriendichte ist (Miller et Bassler 2001). Doch nicht nur die Zelldichte reguliert die Quorum sensing-Kommunikation, sondern auch Umweltbedingungen, wie das Vorkommen von Nährstoffen, oder auch intrinsische Faktoren, wie das Wachstumsstadium der Bakterien selbst. Ein besonders interessanter Aspekt, welcher aus diesen Überlegungen hervorgeht, betrifft das Miteinander der Bakterien. So scheint es, als würden Bakterien «sozial» miteinander interagieren, und sich eher für das Überleben der ganzen Kolonie einsetzen als nur für sich selbst zu kämpfen (Goo et al. 2015).

Wesentlich zur Persistenz der Bakterien im Wirt trägt auch die Bildung von Biofilmen bei. Biofilme ermöglichen es den Bakterien, in unwirtlichen Gegenden zu überleben (Hall-Stoodley et al. 2004), wie auch unter dem Einfluss des menschlichen Immunsystems.

Manche Bakterien sind auch in der Lage, antimikrobielle Peptide zu inaktivieren, wie beispielsweise den proteosomalen Abbau des Komplementfaktors C3b (Okumura et Nizet 2014). Gram-positive Bakterien können Moleküle sezernieren, welche antimikrobielle Peptide binden und so unschädlich für das Bakterium machen. Zudem können Bakterien Enzyme produzieren, welche die antimikrobiellen Peptide direkt abbauen (Okumura et Nizet 2014).

1.2.4 Problematiken und neue Lösungsansätze

Besonders relevant ist in Zeiten von intensivem Antibiotikagebrauch die Häufung multiresistenter Keime. Neue Keime, welche nicht mehr auf die gängigen Antibiotika sensibel sind, stellen unsere heutige wissenschaftliche Gesellschaft vor neue Probleme. Diese Problematik ist allseits bekannt und wird von vielerlei Seiten erforscht (Dimopoulos et al. 2016). So sind die gram-positiven Bakterien zum Großteil noch kontrollierbar, während die gram-negativen Bakterien zum maßgeblichen Problem werden (Rossolini et al. 2014).

In einer Übersichtsarbeit (Ricard 2012) stellt der Autor eine Reihe von modernen therapeutischen Ansätzen vor, welche gewisse Hoffnungen liefern, die antibiotischen Therapiemaßnahmen in Zukunft unterstützen zu können. Eine vielversprechende Therapiemöglichkeit stellen die Bakteriophagen dar. Hierbei handelt es sich um Viren, welche nahezu ausschließlich Bakterien befallen und abtöten. Der Lebenszyklus der Phagen kann lytisch oder lysogen sein. Bereits vor über einem halben Jahrhundert, in den 1950ern wurden in den U.S.A Phagen zur Therapie von verschiedenen infektiösen Erkrankungen, welche nicht auf konservative Antibiotika ansprechen,

erfolgreich eingesetzt. Die Produktion wurde aus nicht-medizinischen Gründen in den 90ern eingestellt (Kutateladze et Adamia 2010). Aus diesen Erfahrungen scheint verständlich, dass Wissenschaftler heutzutage an diesem Ansatz weiterarbeiten. So wurden 2011 Ergebnisse einer in-vivo-Versuchsreihe publiziert (Morello et al. 2011), in welcher Mäuse mit multiresistenten *Pseudomonas aeruginosa* Stämmen infiziert wurden. Es wurde hierbei die Therapie mit einmaliger nasaler Applikation der Phagen 2 h nach Infektion Aerprobt, sowie auch die präventive Maßnahme mit Verabreichung der Phagen 4 Tage vor Infektion. Die Ergebnisse waren überragend und gaben Anlass, weitere Forschung auf dem Gebiet zu betreiben. Daher gibt es nun auch neuere Erkenntnisse aus verschiedensten Tiermodellen (Prazak et al. 2019), welche auch weiterhin vielversprechend erscheinen. Die erste klinische Publikation (Jault et al. 2019) weist nun aber methodische Mängel auf. Eindeutig interpretierbare klinische Studien lassen also weiterhin auf sich warten (Wienhold et al. 2019).

Zudem wird zurzeit an den QSM geforscht. Ein Ansatz ist es, diese Moleküle zu inhibieren. N-acylhomoserin Lactone (AHLs) scheinen eine Gruppe von Verbindungen darzustellen, welche inhibitorische Wirkungen auf die QSM haben. Nun stellte sich das Problem, dass diese AHLs unter physiologischen Bedingungen abgebaut und unbrauchbar werden (Yates et al. 2002). Durch chemische Abwandlung der Verbindung wurde jedoch inzwischen ein neuer Hoffnungsträger synthetisiert, welche eine gute Arbeitsgrundlage für weitere Versuche zur Pharmakologie bietet (Müh et al. 2006).

Auch immunologische Methoden sind auf dem Vormarsch. Angriffspunkt ist zum Beispiel ein Komplex von gram-negativen Bakterien, welcher den Export von Toxinen aus dem bakteriellen Zytosol direkt in das Zytoplasma der Wirtszelle ermöglicht. Teil dieses Komplexes ist das PcrV. Hiergegen wurden Antikörper entwickelt, welche in Tierversuchen einen positiven Effekt aufwiesen (Sawa et al. 1999). Dem folgte eine klinische Studie (Chastre et Dugard 2010) mit 35 Patienten, welche randomisiert, doppel-blind und Placebo-kontrolliert mit einem PcrV-Inhibitor (KB001) behandelt wurden. Einschlusskriterium war eine definierte Besiedlung der Nase mit *Pseudomonas aeruginosa*, aber ohne schon bestehende Pneumonie. Der Beobachtungszeitraum betrug 28 Tage. Es zeigte sich nach 28 Tagen ein verbessertes Überleben in der KB001-Gruppe im Vergleich zur Placebo-Gruppe, und eine halb so große Rate an Pneumonien. Diese Studie scheint vielversprechend, wenn auch natürlich weitere Studien mit größerem Patientenkollektiv nötig sein werden.

1.3 Die Bürstenzelle

1.3.1 Ein besonderer Sinn: der Geschmack

Der Geschmackswahrnehmung von Bitter, Süß und Umami liegt eine metabotrope Signalkaskade zugrunde. Am Anfang dieser Signalkaskade stehen die Geschmacksrezeptoren. Charakterisiert wurden die Rezeptoren Tas1R1, Tas1R2, Tas1R3 und die Familie der Tas2R. Die Monomere der

Tas1R-Familie spielen eine Rolle in der Süß- und Umami-Transduktion (Hoon et al. 1999; Nelson et al. 2001; Nelson et al. 2002), während die Mitglieder der Tas2R-Familie für die Erkennung von Bitterstoffen zuständig sind (Chandrashekar 2000). Es wurde bis dato eine Vielzahl von Tas2R-Rezeptoren beschrieben (Meyerhof et al. 2010). Der biologische Sinn hinter einer solchen Vielfalt an Rezeptoren für eine Geschmacksrichtung wird dort vermutet, dass diese Rezeptoren einen schützenden Effekt haben, da bekanntlich viele giftige Substanzen in der Natur bitter schmecken. Zu den synthetischen Bittersubstanzen gehört Denatonium, welches unter anderem den Tas2R8 (Meyerhof et al. 2010) und den Tas2R4 aktiviert (Chandrashekar 2000; Chandrashekar et al. 2000). Bei diesen metabotropen Rezeptoren der Tas1R und Tas2R-Familie handelt es sich entsprechend der restlichen Signalkaskade (siehe unten) um G-Protein gekoppelte Rezeptoren: GPCRs (G-Protein-coupled receptors). GPCRs stellen einen essentiellen Teil der zellulären Rezeptoren dar, sie vermitteln u.a. die Wirkung von Neurotransmittern, Hormonen und Sinneseindrücke (Rosenbaum et al. 2009). Diese Rezeptoren bestehen aus sieben Transmembrandomänen (α -Helices), welche intra- und extrazellulär (EZ) über sogenannte Loops verbunden sind. Jeweils endständig befindet sich intrazellulär am GPCR ein Carboxyl-Terminus, und extrazellulär ein N-Terminus (Amino-Terminus). Oft binden die Liganden am N-Terminus und bewirken letztlich eine Konformationsänderung des Rezeptors (Latorraca et al. 2017); die genauen Mechanismen sind mannigfaltig und würden hier den Rahmen sprengen. Wenn ein Bitterstoff solch einen Tas2R-Bitterrezeptor also gebunden hat, werden intrazelluläre Prozesse in Gang gebracht. Essentiell für die Signaltransduktion ist nun das G-Protein Gustducin, welches für die Wahrnehmung von Süß und Bitter nötig ist (Wong et al. 1996). Das Gustducin-Heterotrimer besteht aus einer α -Untereinheit, einer β 1- oder β 3-Untereinheit und einer γ 13-Untereinheit (Huang et al. 1999). Im inaktiven Zustand sind diese 3 Elemente zusammengelagert und die α -Untereinheit hat ein Guanosindiphosphat-Molekül (GDP) gebunden. Bei Aktivierung des Tas2R wird das GDP dann durch Guanosintriphosphat (GTP) ausgetauscht. Dadurch kommt es zu einer Konformationsänderung des G-Proteins und die α -Untereinheit löst sich von der $\beta\gamma$ -Untereinheit (welche nicht weiter „gesplittet“ wird). Das neue α -Monomer und das $\beta\gamma$ -Dimer beeinflussen dann weitere Stoffwechselwege. So reguliert die α -Untereinheit die Aktivität der Phosphodiesterase (PDE) (Clapp et al. 2008; Huang et al. 1999) und die $\beta\gamma$ -Untereinheit aktiviert die Phospholipase C β 2 (Huang et al. 1999; Katz et al. 1992). Welche Funktion der Einfluss der α -Untereinheit auf die Phosphodiesterase hat, war lange unklar. Clapp et al. konnten nun aber zeigen, dass bei Gustducin-KO-Mäusen eine deutlich höhere cAMP-Konzentration in den Geschmackssinneszellen besteht. Zudem aktiviert cAMP die Proteinkinase A (PKA), welche wiederum die PLC- β 2 phosphoryliert und somit inhibiert. Die α -Untereinheit von Gustducin wirkt also als Regulator der sonst vorhanden „Grundaktivität“ von cAMP (Clapp et al. 2008) und ermöglicht somit die nötige Signalweiterleitung über die PLC- β 2. Hierfür ist die $\beta\gamma$ -Untereinheit von Gustducin verantwortlich, denn sie aktiviert die PLC- β 2 (Katz et al. 1992). Die Phospholipase spaltet dann Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu den *second*

messengern Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) (Spielman et al. 1994). Die Rolle von DAG ist bis heute nicht endgültig geklärt. Es wird aber angenommen, dass DAG die Proteinkinase C (PKC) aktiviert, welche dann verschiedene Kanäle und Rezeptoren phosphoryliert (Spielman et al. 1994). IP₃ vermittelt den essentiellen Teil der Signalkaskade. Es bindet an den IP₃R3 Rezeptor (Clapp et al. 2001), über welchen aus den intrazellulären Ca²⁺-Speichern Calcium-Ionen freigesetzt werden. Der Anstieg des intrazellulären Ca²⁺-Spiegels aktiviert wiederum den *transient receptor potential cation channel subfamily M member 5* (TRPM5), ein nicht-selektiver Kationenkanal (Zhang et al. 2007). Die Aktivierung des TRPM5-Kanals führt zu einer Depolarisation und somit zur Transmitterfreisetzung.

Die hier beschriebenen Elemente und Zusammenhänge der Signalkaskade zur Geschmackswahrnehmung stammen aus Forschung über den primären Ort des Geschmackes, also den Geschmacksknospen der Zunge. Jedoch wäre es unzulänglich dieses biochemische Geschehen, welches bei der Geschmackswahrnehmung auftritt, nur auf den Mundraum zu beschränken. Der heutigen Wissenschaft sind zahlreiche weitere Gewebe im menschlichen und murinen Körper bekannt, welche Zellen besitzen, die der Chemosensorik von u.a. Bitterstoffen gewachsen sind (Bezençon et al. 2008; Deckmann et al. 2014; Krasteva-Christ et al. 2015). Die Funktionen dieser chemorezeptiven Zellen sind bis dato nur teilweise geklärt; in diesem Kontext findet sich auch die vorliegende Arbeit wieder.

1.3.2 Die solitäre chemosensorische Zelle in der Nase

Die Begriffe SCC (solitäre chemosensorische Zelle) und Bürstenzelle wurden lange Zeit synonym verwendet. Je nach bevorzugtem Gebrauch in den einzelnen Veröffentlichungen, werden in der vorliegenden Arbeit die Begriffe ebenfalls alternierend benutzt.

SCCs kommen in vielen verschiedenen Geweben vor. Eine der frühesten Beschreibungen findet man in der Publikation über die tracheale Bürstenzelle (Rhodin et Dalhamn 1956). Um die Vielfalt und Reichweite dieser Zellart darzustellen, ist es unausweichlich auch die anderen Lokalisationen zu zeigen. So kommen SCCs vielfach im Gastrointestinaltrakt vor: im Magen (Iseki et Kondo 1990), Dünn- und Dickdarm (Bezençon et al. 2008; Höfer et Drenckhahn 1996; Iseki et Kondo 1990; Trier et al. 1987), der Gallenblase (Luciano et Reale 1979), dem Ductus choledochus (Iseki et Kondo 1990; Luciano et al. 1981) und dem Ductus pancreaticus (Weyrauch et Schnorr 1976). Neuer ist die Erkenntnis, dass auch in der Urethra Bürstenzellen zu finden sind (Deckmann et al. 2014), und dies auch speziesübergreifend bei vielen Säugetieren (Deckmann et al. 2015). Auch die Konjunktiva weist solche chemosensorischen Zellen auf (Wiederhold et al. 2015).

Von besonderer Relevanz sind die SCCs in der Nase, denn auch, wenn sie erst später beschrieben wurden (Finger et al. 2003), wurde ihre Funktion, besonders in Hinblick auf die neurogene Entzündung, eher erforscht (Saunders et al. 2014), als es bei den trachealen Bürstenzellen der Fall

war und ist. Die Ergebnisse aus diesen Studien waren wegberaubend für die folgenden Erkenntnisse über Bürstenzellen und ihre Verbindung zur neurogenen Entzündung in den unteren Atemwegen. In den SCCs der Nase wurden GPCRs für die Geschmacksrichtungen süß, bitter und umami nachgewiesen (Braun et al. 2011). Zudem exprimieren die SCCs α -Gustducin und die PLC- β 2 (Finger et al. 2003), den TRPM5-Kanal (Ogura et al. 2011; Yamaguchi et al. 2014), die ChAT sowie VACHT (Ogura et al. 2011). In whole-mount-Färbungen der Nasenschleimhaut mit einem Antikörper gegen Gustducin zeigte sich, dass die weitverteilten positiven Zellen oft länger waren als das Epithel hoch war, sodass sie zugleich Kontakt zur einströmenden Luft apikal wie auch zum Nervensystem basal hatten (Finger et al. 2003). Diese Nervenfasern bildeten nach dem Durchtritt durch die Basalmembran zahlreiche Varikositäten entlang der SCCs; hier konnten auch synaptische Verbindungen dargestellt werden. Ein wesentlicher Unterschied zu den Geschmackszellen der Zunge ist daher, dass die SCCs ihre Informationen über den Neurotransmitter ACh weitergeben, während die Geschmackszellen via ATP mit der Nervenfaser kommunizieren (Finger et al. 2005). Die Informationen, welche dann weitergeleitet werden, müssen von Liganden der Tas2R/Tas1R-Rezeptoren stammen. In der Folge bewirkt die Stimulation von Tas2R38 eine gesteigert Stickstoffmonoxid-Produktion und eine daraus folgende Steigerung der mukoziliären Clearance. Natürlich hat Stickstoffmonoxid (NO) auch eigene antibakterielle Eigenschaften (Miller et al. 2009). In einer umfangreichen Studie wurde zudem das Vorkommen von mRNA für mT2R8 und mT2R19 gezeigt, sowie die Expression der PLC- β (Finger et al. 2003). Finger et al. unterscheiden hier die SCCs von den Bürstenzellen der Trachea von Luciano et al., da sich die Mikrovilli der beiden Zelltypen voneinander abheben. Finger et al. schließen zudem aus, dass es sich bei den neuen SCCs um neuroendokrine Zellen handelt, da sie sich in einer Vielzahl von Charakteristika unterscheiden. Die Entstehung dieser Zellart stellte das nächste Mysterium dar. So zeigten Gulbransen et al. zunächst, dass die SCCs der Nase bei Mäusen schon vor der Geburt vorhanden sind und, dass ihre Entwicklung, Differenzierung und auch Persistenz nicht von der trigeminalen Innervation abhängig sind (Gulbransen et al. 2008). Auch die kontinuierliche Entwicklung der nasalen SCCs wurde von Gulbransen et al. untersucht. Es stellte sich heraus, dass die SCCs eine ähnliche Regenerationsfrequenz zu haben scheinen wie das restliche nasale Epithel und einer durchgehenden Erneuerung unterliegen (Gulbransen et Finger 2005). Für die Entwicklung der TRPM5-positiven nasalen SCCs von Mäusen ist der Transkriptionsfaktor Skn-1a/Pou2f3 nötig (Yamaguchi et al. 2014). Zusammenfassend ist die nasale solitäre chemosensorische Zelle also eine spezialisierte Zelle der Nasenschleimhaut, welche mittels aller üblichen Signal-Proteine die Fähigkeit der Geschmackswahrnehmung besitzt. Hierzu gehört auch der TRPM5-Kanal, für dessen Expression der Transkriptionsfaktor Skn-1a nötig ist. Die SCCs sind cholinerg. SCCs nehmen Gefahrensignale über Bitterrezeptoren wahr und können so antimikrobielle Maßnahmen initiieren. Diese Gemengelage an Ergebnissen über die Funktionen der nasalen SCCs öffnete die Türen für ähnliche und weiterführende Forschung auch auf dem Gebiet der trachealen Bürstenzelle. Die

Ergebnisse bezüglich der SCCs der Nasenschleimhaut sind natürlich nicht vollständig übertragbar, aber sie liefern Ideen dazu, wie die Prozesse in der trachealen Bürstenzelle ablaufen könnten und welche Auswirkungen sie haben könnten.

1.3.3 Die tracheale Bürstenzelle

1.3.3.1 Geschichte

Die erste Beschreibung der Bürstenzelle (BC) stammt aus dem Jahre 1956. Die Autoren beschreiben hier eine genaue Untersuchung des trachealen Epithels der Ratte (Rhodin et Dalhamn 1956). Mittels Elektronenmikroskopie werden die verschiedenen Zelltypen anatomisch beschrieben, so auch die Bürstenzelle. Der Zellkörper der Bürstenzelle reicht von der Basalmembran bis an das Lumen, und entsendet kleine polymorphe Fortsätze. Die Autoren stellen zudem fest, dass die Bürstenzellen oft von einigen Becherzellen umgeben sind. Die Bürstenzellen enthalten Vakuolen und Granula verschiedener Morphologien. Des Weiteren beschreiben die Autoren bereits zu diesem frühen Zeitpunkt ziemlich genau die Anatomie der Fortsätze der Bürstenzellen, welche namensgebend für die Zelle und 1 – 1,5 µm lang sind. Außer den Mikrovilli (welche hier aber noch nicht so genannt werden) weisen die Bürstenzellen noch einen zytoplasmatischen Fortsatz auf. Die Basis ist breit (0,5-1 µm), und die Länge gleicht der der Mikrovilli. Dieser Fortsatz enthält viele Granula und Vakuolen. Dieser neue Zelltyp der Bürstenzelle wird von da an weiter erforscht. Einige Jahre Später veröffentlichen Luciano et al. neue Ergebnisse zu diesem noch recht unbeachteten Zelltyp wiederum bei Ratten. Die Autoren fanden Bürstenzellen erst bei Tieren über einem Alter von 50 Tagen. Bei 14 Tagen alten Tieren konnten Luciano et al. Zellen nachweisen, welche eventuell ein Entwicklungsstadium der Bürstenzelle darstellen könnten. Hier wird zum ersten Mal auch das gehäufte Vorliegen von Bürstenzellen im kleinen Verbund bzw. „paarweise“ beschrieben (Luciano et al. 1968).

Nachfolgend werden Bürstenzellen bei der Ratte auch im Alveolarbereich nachgewiesen (Hijiya et al. 1977). Nun werden die namensgebenden Fortsätze, die Mikrovilli, genauer beschrieben: es handle sich hierbei um ca. 120-140 Mikrovilli pro Bürstenzelle, welche je 0,9-1,2 µm lang und 0,2 µm dick seien. In jedem dieser Mikrovilli befinden sich ca. 170 dünne Filamente welche tief in das Zytoplasma hinein reichen. Interessanterweise fanden sich hier nur Bürstenzellen bei Ratten, welche älter als 7 Wochen waren. Dies würde auch den Beobachtungen von Luciano et al. entsprechen (Hijiya et al. 1977).

Bisher wurde die tracheale Bürstenzelle beim Menschen in der wissenschaftlichen Literatur nur unter pathologischen Umständen beschrieben. Gordon und Kattan beschreiben den klinischen Fall eines 13-jährigen mit der Diagnose des Syndroms der immotilen Zilien. Es werden Biopsien des trachealen Epithels genommen. Es zeigt sich eine Art Metaplasie: die Zilien-tragenden Zellen sind deutlich vermindert, während büstenzellartige Zellen vermehrt vorkommen (Gordon et Kattan 1984). 1988 beschreiben DiMaio et al. den Fall eines Neugeborenen welches im Laufe der Geburt reanimiert

werden musste und in der Folge beidseitige Pneumothoraces bekam. Nach 4 und 14 Monaten wurden Lungenbiopsien entnommen. Das Kind starb nach 17 Monaten und wurde dann obduziert. Bei der ersten Biopsie fanden sich viele Bürstenzellen, bei der zweiten keine mehr. Die Autoren erwägen zwei Erklärungen für das Verschwinden der Bürstenzellen: dies könnte der Therapie mit Cortison geschuldet sein, oder aber dem regenerativen Umbau infolge der Lungenschädigung. Hier werden zum ersten Mal humane alveolare Bürstenzellen beschrieben (DiMaio et al. 1988). In einer weiteren Publikation untersuchten DiMaio und Kollegen die Trachea von 3 Feten aus Schwangerschaftsabbrüchen mit einem Gestationsalter von 14-22 Wochen. Bei einem ca. 19 Wochen alten Fetus konnten Bürstenzellen im trachealen Epithel nachgewiesen werden, mit einem Anteil von 0,5% am Epithel. Dies zeigt also, dass Bürstenzellen prinzipiell auch bei humanen Feten vorkommen können. Die Autoren vermuten hier bereits eine sekretorische Funktion der Bürstenzellen (DiMaio et Meyer 1990), welche später ja auch in verschiedener Hinsicht belegt wurde (Sekretion von ACh (Hollenhorst et al. 2020), Sekretion von IL-25 (Bankova et al. 2018)).

Auch zur Herkunft der Bürstenzellen wurde bereits geforscht. So wird die tracheale Bürstenzelle als eine „stabile Population in einem dynamischen Epithel“ beschrieben. Bürstenzellen können jedoch postnatal aus Progenitorzellen im Epithel regeneriert werden (Saunders et al. 2013). Unter dem Einfluss von Allergenen kommt es zu einer deutlichen Zunahme der Bürstenzellzahl (Bankova et al. 2018). Zudem ist der Transkriptionsfaktor Pou2f3 wesentlich für die Entwicklung von TRPM5-positiven chemosensorischen Zellen (Yamashita et al. 2017).

1.3.3.2 Lokalisation in den Atemwegen

Bürstenzellen finden sich in den verschiedenen Abschnitten der Atemwege. In den oberen Atemwegen, insbesondere der Nase (Finger et al. 2003) und der Tuba auditiva (Krasteva et al. 2012b) wurden Bürstenzellen bereits mehrfach beschrieben.

In den unteren Atemwegen sowie im Larynx finden sich unregelmäßig verteilt Bürstenzellen, vergleichsweise zahlreich sind sie in der Trachea (Chang et al. 1986; Jeffery et Reid 1975). Dies gilt inzwischen als Konsens, auch wenn nicht immer in jeder Etage des Bronchialbaums Bürstenzellen zu finden sind (DiMaio et Meyer 1990). Auch intrapulmonal finden sich Bürstenzellen, sowohl im Alveolarbereich (Meyrick et Reid 1968) als auch in den kleinen intrapulmonalen Atemwegen (Bronchiolen) (Dehkordi et al. 2010). Hijjiya et al. zeigen Unterschiede zwischen der trachealen und der alveolaren Bürstenzelle auf. Letztere ist eher sphärisch und von einer zytoplasmatischen Membran (von Typ I Pneumozyten) bedeckt, während die tracheale Bürstenzelle eher zylindrisch konfiguriert ist und mit keiner Membran bedeckt ist (Hijjiya et al. 1977).

1.3.3.3 Innervation der Bürstenzelle in den Atemwegen

Für die Funktion der Bürstenzelle entscheidend ist ihre Nähe zu Nervenfasern, welche bereits früh beschrieben wurde. Luciano beschrieb schon neuronale Verbindungen zu Bürstenzellen, und präziserte sogar seine strukturellen Ergebnisse. Demnach sah Luciano eine Verdickung der

Membran der Nervenfasern, welche sich gegenüber der Vesikelansammlung der Bürstenzelle befand, und schloss daraus, dass es sich um eine synaptische Verbindung handeln müsste (Luciano et al. 1968). Andere Autoren beschreiben Nachbarschaftsbeziehungen von trachealen Bürstenzellen zu vermeintlich unmyelinisierten (Hijiya et al. 1977) Nervenfasern (Chang et al. 1986). Es ist also schon lange bekannt, dass tracheale Bürstenzellen in engem Kontakt mit nervalen Strukturen stehen. Auch in der Nase konnten Verbindungen der SCCs zu Nerven gezeigt werden, dort bilden die Nervenfasern sogar mehrere Varikositäten an einer SCC (Finger et al. 2003). Finger et al. erachten die SCC der Nasenschleimhaut schon als Komponente des trigeminalen Systems (Finger et al. 2003). Der Kontakt von Bürstenzellen zu Nervenfasern bleibt den Atemwegen nicht vorbehalten, denn auch im Darmepithel finden sich oft Nerven in der Nähe der Bürstenzellen (Bezençon et al. 2008). Mittels konfokaler Beobachtung konnten ebenfalls Kontakte zwischen trachealen Bürstenzellen und peptidergen und nicht-peptidergen Nervenfasern gezeigt werden, wobei die Autoren relativieren müssen da sie bei den meisten Bürstenzellen keinen direkten Kontakt zu Nerven finden konnten (Krasteva et al. 2011). Auch neuere Studien stellen immer wieder eine Nähe von Bürstenzellen zu Nervenfasern fest (Bankova et al. 2018). Summa summarum scheint also klar zu sein, dass Bürstenzellen von Nervenfasern kontaktiert werden, wenn auch nicht immer und auch nicht zwingend direkt.

1.3.3.4 Signaltransduktion der Bürstenzelle in den Atemwegen

Lange war es unklar, wie die Bürstenzellen ihre chemosensorisch wahrgenommene Informationen zunächst intrazellulär und später auch über die Zellgrenzen hinweg weiterleiten. Am Anfang stehen die Geschmacksrezeptoren, der *TasR*-Familie. Bürstenzellen in der Trachea exprimieren eine Vielzahl an verschiedenen Bitterrezeptoren (Liu et al. 2017), wie zum Beispiel *Tas2r108* oder *Tas2r138*. Die Aktivierung dieser metabotropen membranständigen Rezeptoren führt zu Änderungen am angekoppelten Gustducinmolekül (Merigo et al. 2005). Die α -Untereinheit löst sich von der $\beta\gamma$ -Untereinheit. Durch die $\beta\gamma$ -Untereinheit wird die in den Bürstenzellen vorhandene PLC- β 2 (Krasteva et al. 2011; Liu et al. 2017) aktiviert (Hollenhorst et al. 2020). Wie oben schon beschrieben, ist die PLC- β 2 ein Enzym welches PIP2 zu IP3 und DAG umwandelt. So bewirkt IP3 die Freisetzung von intrazellulärem Calcium welches wiederum den TRPM5-Kanal aktiviert (Bankova et al. 2018; Kasse et al. 2007; Schneider et al. 2019). Der TRPM5-Kanal ist als Tetramer konfiguriert, wie auch die anderen Kanäle der TRP-Familie. Jede Untereinheit besteht aus sechs Transmembrandomänen (S1-S6). Zwischen S5 und S6 wird die Pore für die Kationen gebildet. An S1 hängt intrazellulär der namensgebende Melastatin-Teil (Fleig et Penner 2004). Durch den TRPM5-Kanal kommt es dann zu einem Einstrom von Kationen, welche zu einer Membrandepolarisation führen (Behrends JC et al. 2017). Ob einer kausaler Zusammenhang zwischen dieser Depolarisation und der bewiesenen ACh-Ausschüttung durch tracheale Bürstenzellen (Hollenhorst et al. 2020) besteht, ist bis dato nicht

bewiesen. Jedoch scheint diese These belastbar, da Membrandepolarisationen oft eine Neurotransmitter-ausschüttung zur Folge haben.

Die Signalweiterleitung von sensorischen Zellen zu weiteren Effektorzellen oder zu Nervenzellen, welche die Information an andere Strukturen weiterleiten ist eine sehr sinnvolle Erfindung der Natur, denn so wird zum einen das Signal verstärkt und zum anderen wird es möglich, aus einem kleinen Reiz an einem peripheren Ort des Organismus eine systemische (Abwehr-)Reaktion zu generieren. Es ist also wichtig zu verstehen, wie die sensorische Bürstenzellen ihre Informationen weitergeben. Schon seit über 20 Jahren ist bekannt, dass im Atemwegsepithel ACh zu finden ist (Klapproth et al. 1997). Über ein Jahrzehnt später gelang auch der eindeutige Nachweis von ACh in der Flüssigkeitsschicht welche das Atemwegsepithel bedeckt (Hollenhorst et al. 2012). Etwa zeitgleich mit diesem Nachweis wurde festgestellt, dass Bürstenzellen der Trachea cholinerg sind. So zeigten Krasteva et al., dass die ChAT-eGFP-positiven Zellen von reporter Mäusen auch Villin-positiv (Bürstenzell-Marker) sind und es sich dabei somit um Bürstenzellen handeln müsse. Ausserdem konnte gezeigt werden, dass die Bürstenzellen VAcT-Immunreaktiv sind (Krasteva et al. 2011). Andere Gruppen wiesen ebenfalls vermehrt ChAT-Transkripte in trachealen Bürstenzellen nach (Bankova et al. 2018). Erst kürzlich wurde bewiesen, dass die trachealen Bürstenzellen tatsächlich als Reaktion auf adäquate Stimuli ACh freisetzen (Hollenhorst et al. 2020). Die Autoren zeigen hier auch eine Abhängigkeit dieser ACh-Freisetzung von der Geschmackssignalkaskade, insbesondere von der PLC- β 2 und von TRPM5 (Hollenhorst et al. 2020). Ein Teil der hier beschriebenen Elemente der Signalkaskade wird heutzutage als immunhistochemische Marker für Bürstenzellen benutzt, sowie der in der vorliegenden Arbeit benutzte Marker DCAMKL1 (siehe Tabelle 1.1).

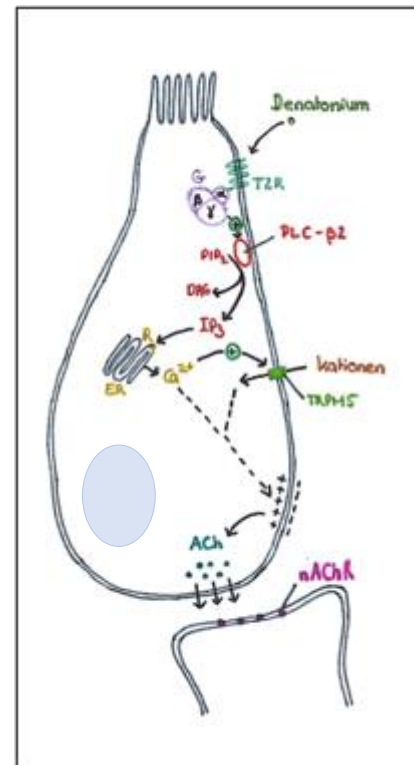


Abbildung 1.1.: Geschmackstransduktionskaskade der Bürstenzelle. Abk: G: G-Protein Gustducin. α , β und γ : Untereinheiten von Gustducin. PLC- β 2: Phospholipase C- β 2. PIP2: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat. DAG: Diacylglycerin. IP3: Inositol-1, 4, 5-triphosphat. TRPM5: transient receptor potential channel M5. ER: endoplasmatisches Retikulum. R: Inositol-1,4,5-triphosphat-Rezeptor Typ III. ACh: Acetylcholin. nAChR: nikotinischer Acetylcholin-Rezeptor

Marker	Protein	beschrieben von
TRPM5	Transient receptor potential channel M5	(Kaske et al. 2007)
DCAMKL1	Doublecortin Like Kinase 1	(Bankova et al. 2018; Gerbe et al. 2009)
PLC-β2	Phospholipase C β2	(Finger et al. 2003; Krasteva et al. 2011)
α-Gustducin	Untereinheit des G-Proteins Gustducin	(Finger et al. 2003; Krasteva et al. 2011)

Tabelle 1.1: Bürstenzellmarker und ihre Erstbeschreibung als solche

Die Mechanismen der Signaltransduktion in der Bürstenzelle der Atemwege ähneln also prinzipiell den Signaltransduktionsmechanismen der Geschmackszellen der Zunge, mit gewissen Unterschieden.

1.3.3.5 Funktionen der Bürstenzelle in den Atemwegen

Schon früh wurden Ideen zu möglichen Funktionen der Bürstenzelle geäußert, und bereits diese frühen Vorschläge kommen recht nah an unser heutiges Verständnis heran. So vermuteten Luciano und Kollegen, dass es sich bei der trachealen Bürstenzelle um eine Art Chemorezeptor handelt (Luciano et al. 1968). Hijiya et al. riefen bei Ratten eine Pneumonie durch transperitoneale Gabe von Bleomycin hervor und stellten eine höhere Anzahl von Bürstenzellen bei den kranken Tieren fest. Außerdem fiel die spezielle Orientierung des Bürstensaums auf, denn dieser setzt in einem schrägen Winkel an. Die Autoren nahmen an, dass diese Anatomie der Überwachung der einströmenden Luft dienen könnte und schrieben der Bürstenzelle eine chemorezeptive Funktion zu (Hijiya et al. 1977). In eine ähnliche und doch leicht andere Richtung dachten Chang et al., denn diese Gruppe konnte besonders viele Bürstenzellen an bronchialen Aufzweigungsstellen finden. Dort lagern sich nach vorherigen Berichten vorzugsweise eingeatmete Partikel ab (Brody et Roe 1983). Chang et al. vermuten eine “entgiftende” Funktion der Bürstenzelle (Chang et al. 1986). Auch die sekretorische Funktion der Bürstenzelle wurde früh vermutet (DiMaio et Meyer 1990) und später in verschiedener Hinsicht bestätigt.

Interessanterweise werden seit kurzem insbesondere zwei Arten von Bürstenzellen in den Atemwegen unterschieden, zum einen die “tuft-1-Zellen” mit den bekannten Charakteristika zur Geschmackswahrnehmung, und zum anderen die “tuft-2-Zellen”, welche vornehmlich in immunologische Prozesse eingebunden sind (Montoro et al. 2018). Besonders bedeutend in dieser Richtung sind die Erkenntnisse von Bankova et al. (2018). So sind Bürstenzellen in einen Kreislauf von Zytokinen und deren Rezeptoren eingebunden und erweisen sich als bedeutsam auch in immunologischen Funktionen (Bankova et al. 2018), welche sich insbesondere durch die Sekretion von IL-25 zeigt.

Im Gegensatz zu dieser gewissermaßen unerwarteter Funktion sucht man weiterhin nach dem Nutzen von altbekannten Elementen der Bürstenzelle. So bewirkt zum Beispiel der T2R-Agonist Denatonium eine Steigerung der bronchialen mukoziliären Clearance beim Meerschweinchen (Ortiz et al. 2016) und beim Menschen (Shah et al. 2009). Eine solche Steigerung der mukoziliären Clearance ist eine akute Schutzmaßnahme gegen das Eindringen und Festsetzen von Pathogenen, dementsprechend vermuten Freund und Lee, dass die T2R der Bürstenzellen zum “schnellen” Teil der angeborenen Immunabwehr gehören, während zum Beispiel die PRRs (pattern recognition receptor) eher zu länger anhaltenden Reaktionen führen (Freund et Lee 2018). Da die Bürstenzellen aber nicht nur Bitterrezeptoren besitzen sondern zum Teil auch Süßrezeptoren (T1Rs), scheint diese Fähigkeit beide “Substanzklassen” zu erkennen auch relevant zu sein (Lasconi et al. 2019).

Bakterien produzieren Formylpeptide (Perniss et al. 2020) und QSM, welche agonistisch an den Bitterrezeptoren der Bürstenzellen wirken. Zunächst wurde gezeigt, dass die Stimulation der Atemwegsschleimhaut mit 3-Oxo-HSL, einem solchen QSM, zu einer langanhaltenden Minderung der Atemfrequenz führte. Für diese Reaktion unabdingbar stellten sich nikotinische AChR und ein intaktes Epithel heraus (Krasteva et al. 2012a). Dieses Ergebnis wurde nochmals geprüft und belegt von Hollenhorst et al. Dort wird gezeigt, dass sowohl Denatonium als auch quorum sensing-Moleküle von *Pseudomonas aeruginosa* zu einer Senkung der Atemfrequenz führen. Weitere wichtige Erkenntnis hier ist die TRPM5- und ACh-abhängige Steigerung der Partikeltransportgeschwindigkeit des trachealen Epithels durch dieselben beiden Substanzen. Die Autoren interpretieren diese Fähigkeit der Bürstenzellen, als Antwort auf bakterielle Signalstoffe ACh freizusetzen, als einen frühen Schritt in der protektiven primären Immunantwort gegen inhalierte Pathogene (Hollenhorst et al. 2020).

Auf diesem aktuellen Wissensstand baut die vorliegende Arbeit auf, denn die Funktionen der Bürstenzellen kommen nun erst nach und nach zum Vorschein und bedürfen weiterer Erforschung. Besonders spannend scheint der neu aufkommende immunologische Kontext, in welchem sich die tracheale Bürstenzelle befindet.

1.4 Die Entzündungsreaktion: ein komplexer Prozess

Um die Prozesse zu verstehen, welche zur neurogenen Entzündung beitragen, sich aber auch unabhängig davon in dem hier beschriebenen Versuchsaufbau ereignen können (z.B. alleine durch die Injektion) und natürlich die oben beschriebene Lungenentzündung mitverursachen, ist es unabdingbar die Grundlagen der Entzündung zu verstehen. Zudem wurde schon früh ein Zusammenhang zwischen Entzündungsreaktionen und der Bürstenzelle gesehen (DiMaio et al. 1988; Gordon et Kattan 1984; Hijiya et al. 1977).

1.4.1 Auslösung einer Entzündungsreaktion

Damit es zu einer Entzündungsreaktion kommt, muss der Eindringling zunächst erkannt werden. Hierfür gibt es Rezeptoren auf vielen Zelltypen (auch Antigen-präsentierende Zellen genannt), besonders auf Phagozyten (Monozyten, Makrophagen), B-Lymphozyten und dendritischen Zellen. Dendritische Zellen sitzen im Epithel der Atemwege und können zytoplasmatische Fortsätze zwischen den Epithelzellen hindurch strecken, und so Antigene in der Atemluft abfangen (Jahnsen et al. 2006; Veres et al. 2011). Zu diesen zellulären Rezeptoren zählen die Toll-like-Rezeptoren (TLR) oder auch die NOD-like Rezeptoren (O'Neill et al. 2013). Zudem gibt es im Blut zirkulierende Proteine welche potentielle Gefahrenstoffe wie Mikroben erkennen können, dazu gehören u.a. die Bestandteile des Komplementsystems.

1.4.2 Die akute Entzündungsreaktion

1.4.2.1 Gefäße

Nachdem der Körper die Bedrohung durch den Eindringling festgestellt hat, kommt es zu einer Reihe von Prozessen. Am Anfang stehen Veränderungen der Gefäße: wesentlich durch Histamin kommt es zu einer Vasodilatation, gefolgt von einer Steigerung der Gefäßpermeabilität. Es kommt zum Exsudat wodurch das Blut visköser wird; die höhere Viskosität in Verbindung mit dem größeren Gefäßdurchmesser führen zur Blutstase, welche dann die Extravasation der Leukozyten erleichtert. Diese und die folgenden Grundmechanismen der akuten Entzündung sind schon lange bekannt und wurden beispielsweise 1977 rekapituliert (Ryan et Majno 1977), auch wenn hier die Rolle von Histamin noch nicht offensichtlich war. Die höhere vaskuläre Permeabilität kommt durch die Retraktion von Endothelzellen (durch Histamin, Bradykinin und Leukotriene) und durch Schäden am Endothel zustande. Histamin scheint NO-abhängig zur Vasodilatation zu führen und die endotheliale Barriere zu schädigen, dies eventuell mittels Kinasen (Ashina et al. 2015). Diese Veränderungen treten besonders im Bereich der postkapillären Venolen auf, wo es dadurch dann auch vermehrt zur Leukozytendiapedese kommt. Manche Bereiche der Venolen haben eine weniger dichte Basalmembran, weshalb dort besonders viel Diapedese stattfindet (Wang et al. 2006). Eine Ausnahme stellt hierbei jedoch die Lunge dar, in welcher die Leukozytendiapedese vorwiegend in den Kapillaren stattfindet. Dies lässt sich zum einen durch den sehr schmalen Durchmesser der pulmonaren Kapillaren erklären, und zum anderen durch das Niederdrucksystem im Lungenkreislauf (Aulakh 2018). So herrscht in den Kapillaren der Lunge also eine ähnliche Umgebung wie in den postkapillären Venolen des großen Kreislaufs.

1.4.2.2 Die Rekrutierung von Leukozyten

Nachdem die Gefäße nun permeabler auch für Zellen sind, müssen die Leukozyten (insbesondere Neutrophile und Makrophagen) in das Gewebe einwandern: es kommt zur Diapedese (Pschyrembel W 2017). Die erste Bindung des Leukozyten an das Endothel ist schwach und wird über Selektine vermittelt: es kommt immer wieder zu Rupturen der Bindungen und neuen Bindungen „stattdessen“;

letztlich wird der Leukozyt dadurch abgebremst (der Vorgang bis hierhin wird „Roller“ genannt) (Ley et al. 2007). Wenn der Leukozyt auf seinem „Rollweg“ auf Chemokine trifft, führen diese über einen GPCR zu einer Konformationsänderung der Integrine des Leukozyten welche hierdurch hochaffin werden (Kolaczowska et Kubes 2013). Am Ende des Rollens bindet der Ligand ICAM-1 vom Endothel z.B. an die Integrine LFA-1 und Mac-1 der Leukozyten, wobei LFA-1 dann der Adhäsion (v.a. durch Integrine vermittelt) am Endothel dient und Mac-1 dem „Kriechen“ auf dem Endothel (hierbei „sucht“ sich der Leukozyt eine geeignete Stelle zur Transmigration) (Phillipson et al. 2006). Um das Endothel zu durchqueren gibt es für die Leukozyten zwei Möglichkeiten: parazellulär oder transzellulär (Feng et al. 1998). Der parazelluläre Weg ist der einfachere und daher auch der häufigste, er dauert ca. 2-5min bis zur Basalmembran (Ley et al. 2007). Der transzelluläre Weg geht mit einem größeren Aufwand einher und dauert erheblich länger (Phillipson et al. 2008): hierbei bilden die Endothelzellen eine Art Zytoplasma-Tasche welche reich an ICAM ist, und umschließen hiermit den Leukozyten (Carman et Springer 2004). Die größte Hürde ist die Basalmembran, welche die Leukozyten vermutlich mittels Kollagenasen durchbrechen, ohne aber merkliche Schäden zu hinterlassen (Marchesi et Florey 1960). Nachdem die Leukozyten durch das Endothel hindurch sind, folgen sie einem Chemokingradienten, welcher sie letztlich an ihr Ziel bringt. Dabei können Leukozyten, wenn sie am „Maximum“ des Gradienten von einem Chemokin angelangt sind, einem neuen Chemokingradienten folgen (Foxman et al. 1997).

Die Chemotaxis bringt die Leukozyten an den Ort ihres Nutzens. Zu den chemotaktischen Substanzen gehören bakterielle Produkte, Zytokine, Komplementfaktoren, Chemokine. Alle binden an GPCR, wodurch second messenger und Kinasen (MAPK oder Rac2 z.B.) aktiviert werden, welche wiederum die Polymerisierung von Aktin induzieren (Petri et Sanz 2018). Hierdurch können die Leukozyten sich mittels Filopodien in die „gewünschte“ Richtung fortbewegen.

Viele Mechanismen münden in die Rekrutierung von Neutrophilen. Durch Kontakt mit PAMPs/DAMPs (pathogen-/damage-associated molecular patterns) werden die „Wächterzellen“ oder auch APCs dazu angeregt IL-1b und TNF (Tumornekrosefaktor) u.a. zu sezernieren; diese Mediatoren initiieren dann die Rekrutierung von Neutrophilen (Williams et al. 2011). Die Mediatoren bewirken dann über Rezeptoren die oben beschriebenen Konformationsänderungen der Membranproteine, welche zur Diapedese nötig sind. Eine besondere Rolle kommt auch IL-17 zu: zum einen können Neutrophile selbst IL-17 synthetisieren und so ihre eigene Rekrutierung fördern (Hoshino et al. 2008), zum anderen gibt es einen Subtyp von natürlichen Killerzellen, die als Reaktion auf LPS (Lipopolysaccharide) IL-17 produzieren und somit die Rekrutierung von Neutrophilen fördern (Michel et al. 2007). Auch Makrophagen können sich an diesem Prozess beteiligen, denn sie besitzen ein C-Typ Lektin (Mincle) welches infolge einer entzündlichen Umgebung (TNF, IL-6, LPS) induziert wird (Matsumoto et al. 1999). Mincle reagiert zudem auf anormalen Zelltod, und produziert dann Zytokine welche zur Neutrophilenrekrutierung beitragen (Yamasaki et al. 2008). Muzine scheinen auch einen Einfluss zu haben, denn Muc5ac fördert die

Migration von Neutrophilen in die Lunge (Koeppen et al. 2013). Es gibt also vielfältige Faktoren, welche die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in die Lunge fördern. Als Gegenspieler wirken einige andere Substanzen und Mechanismen, welche in Kapitel 1.4.2.6 näher beschrieben werden.

1.4.2.3 Der neutrophile Granulozyt

Neutrophile Granulozyten sind besondere Zellen. Ihnen kommen vielfältige Funktionen zu und sie spielen eine wichtige Rolle in der akuten Entzündungsreaktion der Lunge. In den Lungen finden sich besonders viele „gepoolte“ Neutrophile, auch wenn das Zustandekommen dieser Ansammlung nicht endgültig geklärt ist (Summers et al. 2010). Lange wurde angenommen, dass Neutrophile eine relativ kurze Überlebensdauer haben (Kolaczowska et Kubes 2013). Seit 2010 muss dies nun aber in Frage gestellt werden. Pillay et al. schätzten die Lebensdauer von Maus-Neutrophilen auf 18 h und die von zirkulierenden humanen Neutrophilen auf 5,4 Tage (Pillay et al. 2010). Interessant ist zudem, dass in der Maus Neutrophile nur 20% der Blut-Leukozyten ausmachen (Doeing et al. 2003), während es beim Menschen 50-70% sind. Herausstellendes Merkmal der neutrophilen Granulozyten sind die Granula: es gibt die größeren azurophilen (primären) Granula, welche die Myeloperoxidase, Defensine, Lysozyme und Proteasen enthalten und die kleineren spezifischen (sekundäre) Granula, welche viele antimikrobielle Stoffe enthalten, wie Lysozyme. Zuletzt gibt es tertiäre gelatinase-Granula, welche hauptsächlich als Lagerungsstätte für Metalloproteasen dienen (Amulic et al. 2012). Die „Hauptrollen“ der akuten Entzündungsreaktion besetzen neben den neutrophilen Granulozyten auch Makrophagen. Erstere infiltrieren die Lunge bereits früh und werden danach meist abgebaut, wobei sich wie oben beschrieben durch bestimmte Einflüsse die Lebensdauer der Neutrophilen deutlich verlängern kann. Auch ist nicht gänzlich geklärt ob die Neutrophilen vollständig „vor Ort“ sterben und abgebaut werden, oder ob wie auch in anderen Modellen gezeigt zumindest ein Teil wieder in den Blutkreislauf eintritt (Wang et al. 2017). Die Makrophagen „kommen“ erst später an den Ort des Geschehens (wenn sie nicht zuvor schon als Alveolarmakrophagen fungierten) und bleiben länger dort.

1.4.2.4 Die Phagozytose

Nun sind die Effektorzellen der akuten Entzündung also vor Ort. Es geht jetzt darum, den Eindringling zu bekämpfen. Die Phagozytose ist hierbei ein wichtiger Vorgang und besteht aus der Erkennung des zu beseitigenden Partikels, dessen Einschluss in den Leukozyten und letztlich seine „Verdauung“ und Tötung. Zum Schutz vor der Phagozytose haben die körpereigenen Zellen Membranproteine, die signalisieren, dass die jeweilige Zelle zum eigenen Organismus gehört und nicht zu beseitigen ist. Beispiele für solche Proteine sind CD31 und CD47. Nach Bindung des Liganden an den Rezeptor polymerisieren die Rezeptoren und es kommt zur Aktivierung ihrer Signalkaskaden. Letztlich führt der Prozess zur Aktin-Polymerisation mit Bildung von Pseudopodien. Die Pseudopodien umschließen das Pathogen und bilden dann nach Verschmelzung

mit Lysosomen das Phagolysosom, welches einen Reifungsprozess durchläuft. Das Phagolysosom zeichnet sich durch eine hohe Azidität aus (pH 4,5-5). Diese Azidität ist selbst ein Mechanismus der Bakterieneindämmung und -tötung, ist aber auch wichtig für die Funktionalität der lysosomalen Enzyme, welche bei saurem pH aktiver sind. Neben der Azidität des Milieus, sind die reaktiven Sauerstoffspezies für die Zersetzung der Mikroben bedeutsam. Die O₂-Radikale (H₂O₂, Hypochlorit) werden durch Enzyme synthetisiert. Auch Stickstoff-Verbindungen (NO, Peroxynitrit) sowie lysosomale Proteine und Enzyme (Lactoferrin, Defensine, Proteasen, Lipasen, Glykosidasen, Phosphatasen) sind von Bedeutung für die Beseitigung der Pathogene (Flannagan et al. 2012).

1.4.2.5 Einbindung der adaptiven Immunität

T-Lymphozyten entstehen im Knochenmark, reifen im Thymus heran, um nach Abschluss der Reifung und der Selektion in das Blut einzutreten. Von da aus durchwandern sie regelmäßig Lymphgewebe (T-Zellen sind einige Stunden im Lymphgewebe, und gehen dann wieder in Lymphe oder Blut über) auf der „Suche“ nach Antigenen. Um aus dem Blut in das Lymphgewebe zu gelangen, müssen die T-Zellen in den hoch-endothelialen Venolen Diapedese betreiben. Aktiviert wird die T-Zelle durch Kontakt mit einem Peptid-MHC-Komplex (auch Priming genannt), welcher an den T-Zell-Rezeptor bindet. Meist wird den T-Zellen das Antigen von dendritischen Zellen (aber auch von Makrophagen und B-Lymphozyten) mittels MHC I oder MHC II präsentiert. Hierdurch wird die T-Zelle zur Vermehrung (klonale Expansion) und Differenzierung zu T-Effektorzellen (und T-Gedächtniszellen mit gleicher Antigenspezifität) angeregt. Es können verschiedene Arten von T-Zellen entstehen, welche unterschiedliche molekulare Ausstattungen haben. So unterscheidet man CD8-positive zytotoxische Effektorzellen, welche Antigene an MHC I-Proteinen erkennen und so infizierte Zellen erkennen und abtöten können, von CD4-positiven T-Helferzellen, welche Antigene am MHC II-Komplex erkennen und je nach Untergruppe verschiedene Funktionen erfüllen. Es können beispielsweise T_H1-, T_H2-, T_H17-, T_{FH}- sowie T_{reg}-Zellen entstehen.

Die zytotoxischen Subtypen der T-Zell-Familie spielen eine wesentliche Rolle in der direkten Beseitigung von Erregern. Alle kernhaltigen Zellen des menschlichen Organismus haben MHC I-Komplexe an ihrer Zell-Oberfläche, womit sie Peptide von Pathogenen präsentieren können wenn sie mit letzteren infiziert sind. CD8⁺-T-Zellen erkennen die MHC I -Antigen-Komplexe und töten die Zelle samt Pathogen-Inhalt ab. Die Tötung kann durch Granzyme (lösen programmierten Zelltod aus), Perforine (hilft bei der Einbringung der Granzyme in die Zelle) und Granulysin (antimikrobiell, und unterstützt Apoptose) erfolgen. Besondere Beachtung verdient die Präzision dieser Mechanismen, denn es wird i.d.R. wirklich nur die befallene Zelle vernichtet, ohne den Nachbarzellen zu schaden. So werden Krankheitserreger mit größtmöglicher Effizienz getötet und der Gewebeschaden so klein wie möglich gehalten (Murphy K et Weaver C 2018).

Chemokine locken B- und T-Helferzellen an die Grenze von B- und T-Zellzone in sekundär lymphatischen Geweben. Dort treten die beiden Zellarten dann miteinander in Kontakt. Die aktivierten T-Helferzellen stimulieren dann die B-Zellen, indem der CD40-Ligand der T-Zelle mit

dem CD40 der B-Zelle interagiert. Diese Aktivierung der B-Zellen durch T-Zellen ist meist nötig, um eine ausreichende Produktion von Antikörpern zu ermöglichen. Um die Antikörper zu erkennen, besitzen diese Zellen sogenannte Fc-Rezeptoren, welche die konstante Fc-Region der Antikörper binden. Auch Makrophagen und Neutrophile erkennen die Fc-Region von IgG und IgA-Antikörpern, welche ein Pathogen gebunden haben. Die Rezeptoren bewirken dann die Phagozytose und Zerstörung des Erregers. Mastzellen und basophile Granulozyten besitzen Fc-Rezeptoren für IgE-Antikörper und vermitteln so respektive Immunantworten auf Allergene und Parasiten durch die nachfolgende Degranulation von Mediatoren. Auch natürliche Killerzellen (NK-Zellen) besitzen Fc-Rezeptoren und setzen den Inhalt ihrer Granula nach Aktivierung des Rezeptors frei (Murphy K et Weaver C 2018).

ILCs (innate lymphoid cells) verbinden das angeborene mit dem adaptiven Immunsystem; sie werden durch Mediatoren einer lokalen Entzündung aktiviert und koordinieren dann die Entzündungsreaktion. Außerdem nehmen sie Einfluss auf die Differenzierung von T-Lymphozyten. Man unterscheidet 3 Typen: ILC1s, ILC2s und ILC3s mit je unterschiedlichen Funktionsbereichen (Murphy K et Weaver C 2018). Wie immer in der Medizin ist diese Einteilung nicht zu 100% zutreffend. So sind die ILC2s Teil eines Netzwerks von Interaktionen, welche nicht mit Parasiten in Verbindung stehen. Am Anfang steht die Bürstenzelle. Die Bürstenzelle produziert IL-25 (Bankova et al. 2018). IL-25 ist mit IL-2 zusammen in der Lage, ILC2s zu aktivieren (Furusawa et al. 2013). Es gibt neben der Bürstenzelle natürlich noch zahlreiche weitere Einflüsse, welche auf die ILC2s einwirken (Leukotriene, Zytokine, Treg-Zellen, Umwelteinflüsse wie Temperatur, O₂-Gehalt oder pH-Wert) (Moltke et al. 2017).

1.4.2.6 Das Ende einer akuten Entzündungsreaktion

Letztlich muss die Entzündungsreaktion beendet werden, um nicht zu dauerhaften Schäden zu führen. Zum einen geschieht dies einfach durch das „nicht-nachkommen“ von weiteren Stimuli, zum anderen werden aber auch im Verlauf der Entzündung zunehmend anti-inflammatorische Zytokine wie IL-10 oder TNF gebildet. Es kommt außerdem zu sehr spezifischen Prozessen, um eine Rückkehr zur Homöostase zu ermöglichen. Die Hemmung der Einwanderung von weiteren Neutrophilen, die Apoptose der vorhandenen Neutrophilen und deren Efferozytose durch Makrophagen werden mittels Mediatoren und interzellulären Signalen aktiv vermittelt. Auch wird die Art und Menge der Zytokine beeinflusst, so dass sich ein anti-inflammatorisches Milieu einstellt. Wichtig ist zudem die Umwandlung der „normalen“ Makrophagen in anti-inflammatorische Makrophagen (Headland et Norling 2015).

Eine besondere Bedeutung kommt dem sogenannten Mediatoren-Switch zu. Die anfangs sezernierten hauptsächlich pro-inflammatorischen Mediatoren (Prostaglandine, Leukotriene) zur Bekämpfung des Pathogens werden durch anti-inflammatorische Mediatoren ersetzt (Levy et al. 2001). Zu den primär anti-inflammatorischen Mediatoren gehören die Lipoxine (Clària et al. 1996); so bewirkt die Bindung an den LXA₄-Rezeptor eine 50%ige Inhibition der Neutrophilen-

Rekrutierung (Hecht et al. 2009). Auch Resolvine und Protektine haben starke anti-inflammatorische und entzündungsauflösende Wirkungen; sie schützen den Körper vor überschießenden Immunreaktionen (Serhan et al. 2008). Resolvin E1 hemmt im Rahmen einer bakteriellen Pneumonie die Rekrutierung von Neutrophilen, fördert die Bakterien-Clearance und bewirkt niedrigere Zytokin-Spiegel in der Lunge. Letztlich wird das Überleben verbessert (Seki et al. 2010). Glukokortikoide werden allgemein als anti-inflammatorische Mediatoren anerkannt und auch als solche medikamentös eingesetzt. Die murine Lunge ist in der Lage, selbst Glukokortikoide zu synthetisieren, wobei die Synthese unter inflammatorischen Bedingungen (LPS, TNF...) gesteigert wird (Hostettler et al. 2012).

Wie eingangs erwähnt, spielen die Neutrophilen in inflammatorischen Prozessen eine große Rolle; und so natürlich auch in deren Auflösung. Die vorhanden Neutrophilen müssen kontrolliert und „abtransportiert“ werden. Gegen Ende der Entzündungsreaktion werden die neutrophilen Granulozyten zunehmend apoptotisch. Bei der Apoptose gelangen Phosphatidylserine an die Oberfläche der Zell-Bruchstücke, wodurch die Makrophagen zur Phagozytose aufgefordert werden. Nach der Efferozytose wechseln die Makrophagen ihren Phänotyp von M1 zu M2 (Headland et Norling 2015). Allgemein gilt der M1-Phänotyp eher als pro-inflammatorisch und der M2-Phänotyp eher als anti-inflammatorisch (Mills 2015). M2-Makrophagen sezernieren in der Tat bevorzugt IL-10 (welches TNF- α und IL-1 β mittels SOCS3 (suppressor of cytokine secretion 3) inhibiert) und TGF- β (transformin growth factor), welches vielfältige anti-inflammatorischen Funktionen hat (Headland et Norling 2015).

1.4.4 Entzündungsmediatoren

Entzündungsmediatoren sind Substanzen, welche die Entzündungsreaktion regulieren. Die meisten Mediatoren haben eine kurze Halbwertszeit, können aber während ihrer aktiven Phase die Ausschüttung/Aktivierung anderer Mediatoren bewirken (Akdis et al. 2016; Dennis et Norris 2015; Kulkarni et al. 2018; Ricklin et Lambris 2013; Zlotnik et Yoshie 2012).

Die IL-1-Interleukine (IL-1 α und IL-1 β) werden von vielen Zellen produziert, darunter Makrophagen, Lymphozyten und Neutrophile, aber auch Gewebezellen wie Fibroblasten. IL-1 induziert weitere proinflammatorische Proteine. IL-3 wird von T-Zellen und Makrophagen synthetisiert und wirkt als Wachstumsfaktor für hämatopoetische Vorläuferzellen. Das von ILC2s produzierte IL-13 fördert die Migration von dendritischen Zellen aus der Lunge in die Lymphknoten, wo sie ihrer Aufgabe der Antigenpräsentation nachkommen sollen (Halim et al. 2014).

IL-6 wird von Lymphozyten und Granulozyten synthetisiert und induziert akute-Phase Proteine sowie die Leukozyten-Rekrutierung. IL-10 wird von nahezu allen T-Lymphozyten produziert (sowie von Makrophagen und DCs) und hemmt die Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine. IL-17 wird von T_H17-Zellen und vielen verschiedenen Immun- und Gewebezellen sezerniert. Es stimuliert die Rekrutierung von Neutrophilen und wirkt pro-inflammatorisch. Durch Unterdrückung des

Komplementinhibitors Crrpy steigert IL-17 die Komplementaktivität (Murphy K et Weaver C 2018; Suzuki et al. 2013).

Bei inflammatorischen Stimuli wird Arachidonsäure (vierfach ungesättigte Fettsäure) aus Zellmembranen freigesetzt und mittels Cyclooxygenasen zu Prostaglandinen und mittels Lipoxygenasen zu Leukotrienen und Lipoxinen (Eicosanoide) umgewandelt. Prostaglandine und Leukotriene werden bei Bedarf schnell synthetisiert und fördern die Ödembildung an den postkapillären Venolen. PGE₂ hat sowohl pro- als auch antiinflammatorische Wirkungen; so bewirkt es am Neuron Entzündungsschmerzen und kann an Makrophagen die TNF-alpha-Produktion runter und die IL-10-Produktion hoch regulieren. PGD₂ wirkt chemotaktisch auf Neutrophile (Dennis et Norris 2015).

Leukotriene werden in Leukozyten produziert. Es wird immer zuerst LTA₄ synthetisiert, woraus dann die anderen Leukotriene entstehen. LTB₄ wirkt chemotaktisch auf Neutrophile und fördert die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), während LTC₄, LTD₄ und LTE₄ eine Vasokonstriktion und Bronchospasmus bewirken (Bankova et al. 2018) sowie eine Steigerung der Neutrophilen-Extravasation (Dennis et Norris 2015). Die Lipoxygenase, welche die Bildung von Leukotrienen und Lipoxinen ermöglicht, wirkt daher in der Bronchokonstriktion und der Neutrophilen-Rekrutierung mit (Samuelsson 1983). Lipoxine sind eine Art Gegenspieler zu ihren Eicosanoid-Kollegen, denn sie wirken anti-inflammatorisch, indem sie z.B. die Neutrophilen-Rekrutierung hemmen. Lipoxin A₄ z.B. fördert zudem die Efferozytose (Dennis et Norris 2015).

Das Komplementsystem besteht aus löslichen Proteinen im Plasma und deren Rezeptoren in Zellmembranen. Es bildet einen wichtigen Teil der angeborenen und aber auch adaptiven Immunität in der Bewältigung von Infektionen. Die wesentlichen Funktionen dieses Systems sind die Steigerung der Gefäßpermeabilität, die Opsonisierung von Pathogenen und die Chemotaxis von Leukozyten. Die Proteine liegen inaktiv im Blutplasma vor, bis sie durch Proteolyse aktiviert werden. Meist werden die Proteine dadurch selbst zu proteolytischen Enzymen, so entsteht eine Kaskade. Der wichtigste Schritt ist die Aktivierung von Komplementfaktor C3, welcher interessanterweise auch von bronchialen Epithelzellen sezerniert wird (Bajic et al. 2015; Kulkarni et al. 2018; Ricklin et Lambris 2013).

1.4.8 Die neurogene Entzündung

Der Begriff der neurogenen Entzündung wurde in Bezug auf die Trachea wesentlich von Donald McDonald geprägt. Er führte die Methode der Evans Blue Injektion und Messung ein, um die Intensität der Plasmaextravasation zu bestimmen (Brokaw et McDonald 1988). Hierbei wurde der *nervus vagus* elektrisch stimuliert. McDonald untersuchte genauer welche nervalen Strukturen an dieser neurogenen Entzündung beteiligt sind. Hierbei fand er zum einen heraus, dass die Plasmaextravasation v.a. in Venolen stattfindet, und dass diese von Nervenfasern aus dem *Ganglion superius nervi vagi* oder dem rostralen Teil des *Ganglion inferius nervi vagi* stammen (McDonald et

al. 1988). Auch interessierte ihn inwiefern Substanz P-haltige Neurone im trachealen Gewebe vertreten sind: er fand einen Anteil von 90% der Substanz-P-haltigen Neurone an der PGP9.5-positiven „Gesamtheit“. Von den Substanz-P-haltigen Neuronen innervierten mit einem Anteil von 32% die Arteriolen der Trachea aber nur wenige direkt (mit $\leq 10 \mu\text{m}$) die postkapillären Venolen (Baluk et al. 1992). Diesbezüglich wurde eine Diffusion von Substanz P vermutet, um mangels direkten Kontaktes dennoch eine Plasmaextravasation an den Venolen zu bewirken. Allgemein ist dies eine relevante Frage, wie bestimmte neuronale Mechanismen aktiviert werden, da die Neuronen in der Regel keine direkte Verbindung zum Lumen der Trachea haben. Hierbei spielen die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Bürstenzellen eine wichtige Rolle. Sie dienen als Sensoren für verschiedene Stoffe, wie QSM (Krasteva et al. 2012a) oder Bitterstoffe wie Denatonium (Hollenhorst et al. 2020). Denatonium wird mittels T2R wahrgenommen, die oben beschriebene Signalkaskade (Kapitel 1.3.3.4, Abb. 1.1) wird aktiviert und führt zur Öffnung und Aktivierung des TRPM5-Kanals. Durch den folgenden Kationeneinstrom (Hofmann et al. 2003) wird Calcium aus intrazellulären Speichern freigesetzt. Letztlich wird ACh freigesetzt, welches als Neurotransmitter an nAChR auf den peptidergen trigeminalen bzw. vagalen Nervenfasern im Epithel bindet. Äste dieser Nerven wiederum geben CGRP und Substanz P ab, welche oft zusammen in Neuronen gespeichert sind (Wiesenfeld-Hallin et al. 1984). Dass die Stimulierung von ACh-Rezeptoren zur Freisetzung von CGRP in der Trachea von Nagetieren führt, wurde bereits früh gezeigt (Jinno et al. 1994). Substanz P bindet dann an NK1-Rezeptoren vom Endothel und von Mastzellen, um so zu den Merkmalen der neurogenen Entzündung zu führen. Typisch für die neurogene Entzündung sind die Plasmaextravasation, Mastzelldegranulation, und Rekrutierung von Neutrophilen (Choi et Di Nardo 2018; Hollenhorst et al. 2020; Saunders et al. 2014). Diese typischen Merkmale werden mit unterschiedlichem Anteil von CGRP und Substanz P beeinflusst. So ist CGRP insbesondere für die Vasodilatation (als Grundlage für die restlichen Prozesse) wichtig, während Substanz P vor allem die Plasmaextravasation fördert (Haass et Skofitsch 1985; Khalil et Helme 1989). Die Rekrutierung von Neutrophilen wird wesentlich durch die Bindung von Substanz P an den NK1-Rezeptor vermittelt, wodurch die Adhäsion an das Endothel gefördert wird (Baluk et al. 1995). In einem Colitis-Modell konnte zudem ein protektiver Effekt von CGRP auf Entzündungsprozesse gezeigt werden (Reinshagen et al. 1998).

Die neurogene Entzündung stellt also einen Prozess dar, bei welchem Nervenfasern aktiviert werden und infolgedessen Stoffe freisetzen. Diese Stoffe führen zu einer Plasmaextravasation und einer Rekrutierung von Immunzellen (Hollenhorst et al. 2020).

1.5 Denatonium als Induktor in einem Modell der neurogenen Entzündung

Denatonium ist die bitterste bekannte Substanz. Denatonium wird als übel schmeckende Substanz verwendet, um zum Beispiel Rattengift für Kinder uninteressant zu gestalten. Denatonium wird auch in einigen Haushaltsmitteln zugesetzt (Pulce et al., 14.04.2020). Chemisch gesehen handelt es sich

um ein quartäres Amin mit lipophoben Eigenschaften (Finger et al. 2003). Denatonium liegt meist als Verbindung mit Benzoesäure vor, wie auch die in der vorliegenden Arbeit verwendete Substanz (U.S. National Library of Medicine, 14.04.2020).

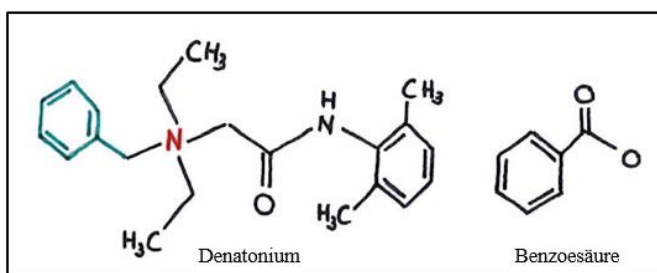


Abbildung 1.2: Strukturformel von Denatonium benzoate. In **blau** ist die Benzyl-Gruppe markiert, und in **rot** der Amin-Stickstoff.

Denatonium ist als Bittersubstanz ein Ligand für T2Rs auf der Zunge aber auch in extraoralen Geweben. Es werden jedoch nicht alle T2Rs von Denatonium aktiviert, T2R38 z.B. nicht. Aktiviert werden durch Denatonium beim Menschen z.B. der T2R4, T2R8, T2R10, T2R13, T2R39, T2R43, T2R46, T2R47 (Meyerhof et al. 2010). Bei der Maus wird der Tas2R108 durch Denatonium aktiviert (Wu et al. 2005). Auch Tas2R105, Tas2R123, Tas2R135 und Tas2R140 werden durch Denatonium aktiviert (Lossow et al. 2016).

Wirkung		Nachweis	
Intrazellulärer	Ca ²⁺ -Anstieg	in	(Hollenhorst et al. 2020)
Bürstenzellen			
Steigerung der mukoziliären Clearance			(Ortiz et al. 2016; Shah et al. 2009)
Steigerung		der	(Hollenhorst et al. 2020)
Partikeltransportgeschwindigkeit			
Verlangsamung der Atmung			(Finger et al. 2003; Hollenhorst et al. 2020)
Bronchodilatation			(Ortiz et al. 2016; Pulkkinen et al. 2012)
Ausschüttung	von ACh	durch	(Deckmann et al. 2014; Hollenhorst et al. 2020)
Bürstenzellen			
Ausschüttung von Defensinen u.a.			(Lee et al. 2014)

Tabelle 1.2: Wirkungen von Denatonium in den Atemwegen

1.6 Fragestellung

Aus vorherigen noch nicht publizierten Versuchen der eigenen Arbeitsgruppe geht hervor, dass eine Stimulation des trachealen Epithels der Maus mit Denatonium *in vivo* zu einer neurogenen Entzündung führt. Bisher wurde hierbei nur die akute Antwort nach 30 min untersucht.

Es ist daher nicht bekannt, wie sich diese Form der Entzündung über einen längeren Zeitraum verhält. Das Ziel der Arbeit war daher die Beurteilung der durch Bürstenzellstimulation ausgelösten Entzündung bis zu sieben Tage nach der Substanzgabe. Zudem interessierte uns die Abhängigkeit

der beobachteten Entzündungsreaktion von dem Kationenkanal TRPM5, welcher in den Atemwegen nur von Bürstenzellen exprimiert wird. Ein weiteres Ziel der Arbeit war es, die Funktion der trachealen Bürstenzellen und des TRPM5-Kanals weiter zu ergründen. Hierzu wurden die Bürstenzellen und Zellen des Immunsystems quantifiziert.

Die vorliegende Arbeit untersucht daher tierexperimentell die Entwicklung der Entzündungsreaktion der unteren Atemwege nach Stimulation der trachealen Bürstenzellen.

2. Material und Methodik

2.1 Chemikalien und Reagenzien

Substanz	Referenz	Strukturformel	Hersteller
Citronensäure	6490.1	$C_6H_8O_7$	Carl Roth, Karlsruhe
Denatonium benzoate	D5765-5G	$C_{28}H_{34}N_2O_2$	Sigma-Aldrich, Steinheim
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	6335.1	$C_{16}H_{17}Cl_2N_5$	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol 70%		C_2H_5OH	Zentrales Chemikalienlager UKS
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	20302.180	$C_{10}H_{16}N_2O_8$	Sigma-Aldrich, Steinheim
Flüssiger Stickstoff		N_2	Westfalen, Münster
Glycerol	G5516	$C_3H_8O_3$	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isofluran (Zul.-Nr.: 2594.00.00)	B506	$C_3H_2ClF_5O$	AbbVie, Ludwigshafen
2-Methylbutan	3927.2	C_5H_{12}	Carl Roth, Karlsruhe
Mowiol 4-88	81381	$[-CH_2CHOH-]_n$	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumchlorid	121221000U	$NaCl$	Grüssing, Filsum
Natriumdihydrogenphosphat x2 H_2O	121321000U	$NaH_2PO_4 \times 2 H_2O$	Grüssing, Filsum
di-Natriumhydrogenphosphat x2 H_2O	121491000U	$Na_2HPO_4 \times 2 H_2O$	Grüssing, Filsum
Natronlauge	1.37031.1002	$NaOH$	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	15,812-7	$HO(CH_2O)_nH$	Sigma-Aldrich, Steinheim
Pferdeserum	16050122	-	Fisher Scientific
Pikrinsäure	197378	$C_6H_3N_3O_7$	Sigma-Aldrich, Steinheim
Polyvinylpyrrolidon	A2259,0500	$(C_6H_9NO)_n$	AppliChem, Darmstadt

Procainhydrochlorid	P9879	C ₁₃ H ₂₁ ClN ₂ O ₂	Sigma-Aldrich, Steinheim
Saccharose	4621.1	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	Carl Roth, Karlsruhe
Salzsäure 37%	05430.4700	HCl	Bernd Kraft, Duisburg
bovines Serumalbumin	01400.100	-	Biomol, Hamburg
TRIS (Trizma Base)	T1503	C ₄ H ₁₁ NO ₃	Sigma-Aldrich, Steinheim
Triton X 100	3051.3	C ₁₄ H ₂₂ O(C ₂ H ₄ O) _n	Carl Roth, Karlsruhe
Tween	P9416	C ₅₈ H ₁₁₄ O ₂₆	Sigma-Aldrich, Steinheim

Tabelle 2.1: Verwendete Chemikalien und Reagenzien

2.2 Lösungen und Puffer

Folgende Lösungen und Puffer wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet:

Lösung A (0,2 M): 31,2 g NaH₂PO₄ x 2 H₂O werden ad 1000 ml Aqua bidest. gelöst.

Lösung B (0,2 M): 35,6 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O werden ad 1000 ml Aqua bidest. gelöst.

Phosphatpuffer (PP) 0,2 M: 115 ml Lösung A werden mit 385 ml Lösung B vermischt, der pH wird auf 7,4 eingestellt.

0,1 M PP: 500 ml 0,2 M Phosphatpuffer werden mit 400 ml Aqua bidest. gemischt, der pH wird auf 7,4 eingestellt. Die Lösung wird ad 1000 ml mit Aqua bidest. aufgefüllt.

10x PBS: 57,5 ml 0,2-molare Lösung A werden mit 192,5 ml 0,2-molarer Lösung B vermischt, darin werden 44,8 g Natriumchlorid gelöst und ad 900 ml Aqua bidest. aufgefüllt. Die Lösung wird auf pH 7,4 eingestellt und ad 1000 ml Aqua bidest. aufgefüllt.

1x PBS: 100 ml 10x PBS werden ad 900 ml Aqua bidest. verdünnt und der pH auf 7,4 eingestellt. Die Lösung wird ad 1000 ml mit Aqua bidest. aufgefüllt.

4% Paraformaldehyd: 40 g Paraformaldehyd (PFA) werden ad 500 ml Aqua bidest. gelöst, die Lösung wird dann langsam auf 70°C erwärmt, mit 0,2-molarer Natronlauge geklärt. Nun lässt man die Lösung abkühlen, gibt 500 ml 0,2-molaren PP hinzu und stellt letztlich den pH auf 7,4 ein. Das 4-prozentige PFA wird auf 0,2 µm steril filtriert.

Gepuffertes Glycerol: 1,5-molare Lösung A (159 g/l) und 1,5-molare Lösung B (126 g/l) werden angesetzt. Lösung B wird auf 50°C für 5 Stunden erhitzt und dann mit Lösung A auf pH 8,6 eingestellt. Nun wird zu dem bestehendem Puffer (bestehend aus Lösung B und Lösung A) die gleiche Menge an Glycerol zugesetzt. Das gepufferte Glycerol wird in Falcons aliquotiert und bei Raumtemperatur im dunklen aufbewahrt.

Blockierungslösung: Die Blockierungslösung besteht aus 10% normalem Pferdeserum, 0,5% Tween und 0,1% bovinem Serumalbumin, die in PBS gelöst werden. Der pH wird auf 7,4 eingestellt.

Mowiol: Es werden 6 g Glycerol mit 2,4 g Mowiol , 6 ml Aqua bidest. und 12 ml 0,2 M TRIS Puffer pH 8 für 4 Stunden mit dem Magnetrührer vermischt. Anschließend wird die Suspension 2 Stunden ruhen gelassen, dann für 10 min bei 50°C im Wasserbad inkubiert. Nun wird die Lösung für 15 min bei 5000g zentrifugiert, und letztlich aliquotiert und bei -20 °C eingefroren.

PBS-S: Hierbei handelt es sich um einfaches PBS, welches die doppelte Menge an NaCl enthält. Es werden 44,8 g NaCl mit 100 ml 10x PBS ad 1000 ml Aqua bidest. gelöst. Der pH wird auf 7,4 eingestellt, die Lagerung erfolgt bei -20°C.

Vorspüllösung (PVP): 25 g PVP (Polyvinylpyrrolidon) werden mit 9 g NaCl und 5 g Procainhydrochlorid ad 1000 ml Aqua bidest. gelöst. Der pH wird mit pH-Papier auf ca. 7,4 eingestellt, da das Detergens die Elektrode des pH-Meters schädigen würde. Die Vorspüllösung wird auf 0,2 µm steril filtriert.

Zamboni: 50 ml 37%ige Formaldehydlösung, 500 ml 0,2M PP und 150 ml Pikrinsäure werden vermischt und auf 1000 ml mit Aqua bidest. aufgefüllt.

2.3 Antikörper

In der vorliegenden Arbeit wurden die folgenden Antikörper zur immunhistochemischen Darstellung genutzt.

2.3.1 Primäre Antikörper

Antikörper	Wirtsspezies/ Klon	Verdün- nung	Vorbehandlung	Quelle
Ly6G	Ratte Clone RB6-8C5)	1:3000	Blockierung	Invitrogen (Ref: 14-5931-82), USA
Ly6G-FITC	Ratte (monoclonal, IgG2b, Clone RB6-8C5)	1:100	Blockierung	LifeTechnologies, USA Ref.: RM 3001
MHCII	Ratte (monoclonal, IgG3a, kappa)	1:8000	Blockierung	eBioscience, USA (15-5321-82)
CD11b	Ratte (monoclonal, M1/70, IgG2b)	1:800	Blockierung + 30 min Permeabilisierung mit Triton X 100	eBioscience, USA (69-0112-82)
CD11c	Armenian Hamster (monoclonal, N418, IgG)	1:800	Blockierung + 30 min Permeabilisierung mit Triton X 100	eBioscience, USA (14-0114-82)
F4/80	Kaninchen (monoclonal IgG)	1:100	Blockierung	Abcam, UK (ab111101)
F4/80	Ratte (monoclonal IgG)	1:800	Blockierung mit zusätzlich 0,3% Triton X 100	eBioscience, USA (41-4801-82)

CD3 (biotin-konj.)	Maus (PC3/188A), monoclonal	1:100	Blockierung + Antigendemaskierung (Citronensäure pH 3 und 9 für 10 min in der Mikrowelle)	Santa Cruz, USA (sc-20047 B)
CD3, FITC-konj.	Ratte (IgG2b, kappa)	1:200	Blockierung mit zusätzlich 0,3% Triton X 100	eBioscience, USA (11-0032-82)
CD45R/B220 (biotin-konj.)	Ratte (IgG2a, kappa)	1:800	Blockierung	BD Bioscience, USA, Cat.: 553085
TRPM5-794 affi	Kaninchen	1:800	Blockierung + 30 min Permeabilisierung mit Triton X 100	Prof. Flockerzi, Institut für klinische und experimentelle Pharmakologie, Universität des Saarlandes.
DCAMKL1	Kaninchen (polyclonal, IgG)	1:1600	Blockierung + 30 min Permeabilisierung mit Triton X 100	Abcam, UK ab31704
PGP 9.5	Kaninchen (polyclonal, IgG)	1:1600	Blockierung	Abcam, UK Ab15503
CGRP	Ziege (polyclonal, IgG)	1:8000	Blockierung	Acris, BP 022 Deutschland
Lectin-FITC	Baudeiraea simplicifolia	1:1000	Blockierung	Sigma (L9381- 2MG), Deutschland
CD31	Ratte (Clone SZ31, monoclonal IgG2a)	1:400	Blockierung	Dianova (Ref.: DIA-310) Deutschland
C3 Komplement	Ratte	1:3200	Blockierung	Novus Biologicals (NB200-540), USA

Tabelle 2.2: tabellarische Aufstellung der verwendeten primären Antikörper unter Angabe der eingesetzten Konzentrationen und Bezugsquellen. Die genauen Methoden der Vorbehandlung sind Kapitel 2.11 zu entnehmen.

2.3.2 Sekundäre Antikörper

Antigen	Wirtsspezies	Konjugat	Verdünnung	Quelle
Ratte-Ig	Esel	Cy3	1:1000	Jackson-Immuno Research Laboratories, Suffolk, Groß- britannien

Ratte-Ig	Esel	Cy5	1:1600	Jackson-Immuno Research Laboratories, Suffolk, Großbritannien
Kaninchen-Ig	Esel	Cy3	1:1000	Merck Millipore, Burlington, U.S.A.
Kaninchen-Ig	Esel	Cy5	1:500	Jackson-Immuno Research Laboratories, Suffolk, Großbritannien
Grauer Zwerghamster (Cricetus migratorius)	Ziege	Cy3	1:800	Jackson-Immuno Research Laboratories, Suffolk, Großbritannien
Biotin	Streptavidin (Streptomyces)	Cy3	1:16.000	Jackson-Immuno Research Laboratories, Suffolk, Großbritannien

Tabelle 2.3a: tabellarische Aufstellung der verwendeten sekundären Antikörper unter Angabe der eingesetzten Konzentrationen und Bezugsquellen

Um die gewünschten Epitope sichtbar zu machen, wurden wie in Tab. 2.3a dargestellt verschiedene Fluorochrome genutzt. Bei Mehrfachfärbungen wurden beispielsweise Cy3, Cy5 und FITC angewandt. Bei Cy3 und Cy5 handelt es sich um Cyanine, synthetische Farbstoffe (Kvach et al. 2008). FITC ist ein Fluoresceinderivat, bei welchem ein Wasserstoffatom durch eine Isothiocyanatgruppe ersetzt wurde (Riggs et al. 1958). Die den Fluorochromen entsprechenden Wellenlängen sind Tabelle 2.3b zu entnehmen.

Fluorochrom	Absorptionsmaximum	Emissionsmaximum
Fluoresceinisothiocyanat (FITC)	488 nm	520 nm
Cyanin 3 (Cy3)	550 nm	570 nm
Cyanin 5 (Cy5)	650 nm	670 nm

Tabelle 2.3b: spektrale Eigenschaften der Fluorochrome

Die jeweiligen Hersteller sind Tabelle 2.3 zu entnehmen.

2.4 Laborbedarf und Geräte

2.4.1 Laborbedarf

In der vorliegenden Arbeit wurde folgender Laborbedarf verwendet.

Fabrikat	Hersteller
CELLSTAR Polypropylen Röhrchen 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen

Cryomold Standard (25 × 20 × 5 mm) und Biopsy (10 x 10 x 5 mm)	Sakura Finetek, U.S.A.
Deckgläser 24 x 60 mm, Glasdicke 0,13 – 0,16mm	R. Langenbrinck, Emmendingen
Einmalhandschuhe	Abena, Dänemark
Einmalinjektionskanüle (Gr. 20 und 16)	Braun, Melsungen
Einmalspritze 1 ml (BD Plastipak)	Becton Dickinson, Madrid, Spanien
Eis	AF 100 Scotsman, Flockeneisbereiter
Fettstift Dako Pen	Glostrup, Denmark
Filterpapier	Macherey-Nagel, Düren
Mikroreaktionsgefäße 1,5 ml, 2 ml, 5ml	Sarstedt, Nümbrecht
Objektträger Super Frost Plus (25 x 75 x 1mm)	R. Langenbrinck, Emmendingen
Objektträger Wärmetisch	Medax, Neumünster
Parafilm	Carl Roth, Karlsruhe
Pipetten 2,5-1000 µl	Brand, Wertheim
Pipettenspitzen 1-10 µl, 10-200 µl, 200-1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettierhilfe LABSOLUTE	Th.Greyer, Renningen
Tissue Tek O.C.T Compound	Sakura, U.S.A.
Transferpipette 6 ml	Sarstedt, Nümbrecht

Tabelle 2.4: tabellarische Aufstellung des verwendeten Laborbedarfs unter Angabe der Bezugsquellen

2.4.2 Geräte

Gerät	Hersteller
Absaugeinheit Knf LAB Laboport	Knf Neuberger, Freiburg
Analysewaage ABS-N/ABJ-NM	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Axio Scan.Z1 (AG Prof. Ulrich Böhm, experimentelle Pharmakologie, Universität des Saarlandes)	Zeiss, Oberkochen
Axio Imager M2 (Fluoreszenzmikroskop), Seriennummer: 3525002370	Zeiss, Oberkochen
Gefrierschrank -80°C HFU600TV	Thermo Fischer Scientific
Kamera AxioCam 506 Mono	Zeiss, Göttingen
Kamera AxioCam 512 Color	Zeiss, Göttingen
Kryostat Leica CM 1950	Leica, Bensheim
Kühlschrank 4°C sch800/R	GGM Gastro, Gronau
Kühlschrank mit Gefrierschrank 4°C/-80°C	Bauknecht, Stuttgart

Magnetrührer IKAMAG RET G	Kurt Migge, Heidelberg
Mikroskop Leica MZ 95	Leica, Bensheim
Schüttelgerät ST 5, wippend	Zipperer, Ballrechten-Dottingen
Vortexer RS-VA 10	Phoenix Instruments, Garbsen
Wärmematte HK Limited Editin Typ P10	Beurer, Ulm
Zentrifuge Galaxy MiniStar	VWR, Radnor, U.S.A

Tabelle 2.5: tabellarische Aufstellung der genutzten Geräte unter Angabe des Herstellers

2.5 Veterinärmedizinischer Bedarf

Fabrikat/Substanz	Hersteller
Bepanthen-Augensalbe	Bayer, Leverkusen
Carprofen (Zul.-Nr.: 400684.00.00)	Zoetis, Berlin
Heparin-Natrium (5000 I.E./ml)	Braun, Melsungen
Ketaset (Wirkstoff Ketamin 100 mg/ml; Zul.-Nr.:402082.00.00)	Zoetis, Berlin
Rompun (Xylazinhydrochlorid) 2% (Zul.-Nr. 6293841.00.00)	Bayer, Leverkusen
Injektionskanüle (SYR 250 µl, ga22/51mm/pst3)	Hamilton Central Europe, Rumänien
Nahtmaterial (steril, multifil geflochten, resorbierbar, USP 5/0, 3/8 19mm)	Eickemeyer, Tülingen
OP-Besteck	Fine Science Tools, Heidelberg

Tabelle 2.6: tabellarische Aufstellung des verwendeten medizinischen Bedarfs unter Angabe des Herstellers

2.6 Tiere

Die Versuche wurden an Mäusen des Stammes C57Bl6/J (Wildtyp) und an TRPM5^{-/-} Mäusen durchgeführt. Im Folgenden werden die Wiltypen auch als TRPM5^{+/+}-Tiere bezeichnet. Die Wildtypen stammten aus eigener Zucht sowie aus den Janvier Labs (Frankreich). Die TRPM5^{-/-}-Mäuse stammten ebenfalls aus eigener Zucht, sowie von Dr. Vladimir Chubanov (Ludwig-Maximilians-Universität München, Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie). Erstmals nachvollziehbar gezüchtet wurden die TRPM5^{-/-} Mäuse von Damak und Kollegen (Damak et al. 2006). Damak et al. wollten herausfinden welche Funktion der TRPM5-Kanal in vivo bei der Geschmackswahrnehmung erfüllt, bezüglich der Geschmacksrichtungen bitter, süß und umami. Hierzu wurde sämtliche Expression der TRPM5-Proteine unterdrückt, durch Generierung eines

genetisch veränderten Mausstamms. Als Grundlage dienten TRPM5-positive Klone der DNA von C57BL/6J-Mäusen, anhand welcher der Vektor konstruiert wurde. Der Vektor wurde dann in C57BL/6J embryonale Stammzellen eingefügt. Mithilfe positiver Klone wurden Chimäre generiert, welche mit C57BL/6J verpaart wurden, um somit heterozygote Mäuse zu generieren. Die Heterozygoten wurden dann wiederum miteinander verpaart um letztlich die TRPM5^{-/-} homozygoten Mäuse zu erhalten.

Die weiblichen Mäuse (n=21) wogen 18,5 bis 25 g, während die männlichen Mäuse (n=12) 23 bis 29 g wogen. Die Mäuse waren alle zwischen 8 Wochen und 4 Monaten alt. Die Mäuse wurden bei konstanter Raumtemperatur und Luftfeuchtigkeit, einem zwölf-stündigem Tag-Nacht-Rhythmus und durchgehendem Zugang zu Futter (Altromin, Lage) und Wasser gehalten. Die Haltung sowie sämtliche Eingriffe erfolgten unter der Tierversuchsantragsnummer 40/18 gemäß der Tierschutzrichtlinie der Universität des Saarlandes (27. Juli 2017) und somit dem deutschem Tierschutzgesetz. Die Tiere wurden durch Inhalation von Isofluran (AbbVie, Ludwigshafen) getötet.

2.7 Versuchsgruppen und Operation der Mäuse

Um die Auswirkungen der Bürstenzell-Stimulation über einen Zeitraum von sieben Tagen zu untersuchen, muss das Stimulanz Denatonium an seinen Wirkort appliziert werden. Es zeigte sich anhand von Erfahrungswerten der Arbeitsgruppe, dass das erfolgreichere, zielsichere und schonendere Verfahren für die Tiere die Injektion in die operativ freigelegte Trachea ist, anstatt der Intubation. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die operative Methode angewandt. Die Gabe von Substanzen erfolgte freundlicherweise durch Frau Professor Gabriela Krasteva-Christ.

Die Mäuse wurden in eine 1-Tages, eine 3-Tages und eine 7-Tages Gruppe aufgeteilt, wobei jede Gruppe letztlich mindestens 4 Tiere beinhaltete. Zudem wurden als Kontrollen je 3 TRPM5^{-/-}-Mäuse und 3 Wildtypen nur mit dem Vehikel PBS behandelt (also ohne Denatonium). Im Folgenden werden diese Gruppen als Vehikelgruppen bezeichnet. Um einen Referenzwert zu bekommen, wurden außerdem 3 Mäuse von jedem Mausstamm perfundiert, ohne vorherige Injektion, sodass uns ermöglicht wurde, den Einfluss der Operation auf die lokale Entzündungsaktivität der Trachea zu beurteilen. Diese Gruppe wird im Folgenden als Kontrollgruppe benannt.

Für die Injektion wurde das Denatonium zunächst als Stocklösung (100 mM) in sterilem Wasser angesetzt. Kurz vor der Operation wurde es schließlich auf die 1mM-Endkonzentration mit sterilem PBS aliquotiert.

Die Mäuse wurden narkotisiert (hierbei Schutz der Augen vor dem Austrocknen durch Bepanthen-Augensalbe) mittels Rompun und Ketanest durch intraperitoneale Verabreichung (Dosierung: 0,75 ml Rompun und 0,85 ml Ketanest ad 10 ml NaCl, 0,1 ml/10 KGMaus) und dann auf einer Styroporplatte mit Klebeband an den Extremitäten und mit leicht überstrecktem Hals fixiert, wie in Abb. 2.1A dargestellt. Im ersten Schritt wurden die Haare über dem Operationsgebiet (ventraler Hals) grob entfernt. Dann erfolgte unter dem Mikroskop ein ca. 5 mm langer medianer Hautschnitt

mit chirurgischer Schere, über der Trachea. Die großen glandulae parotidae wurden beiseite gehalten. Mit einer Injektionskanüle von 22 Gauge wurden dann nach Durchstechen des Ligamentum cricothyroideum medianum intratracheal im kranialen Drittel (Knorpelspangen 1-4) 40 µl 1mM-Denatonium injiziert (siehe Abb. 2.1B). Daraufhin wurde die Anatomie wiederhergestellt, durch Reposition der Gll. Parotides. Es erfolgte die Naht der Wunde mit einem multifilen geflochtenen resorbierbaren chirurgischen Faden. Nach «Hautschluss» erhielten die Tiere 100 µl Caprofen in einer Dosierung von 1 mg/ml als intraperitoneale Injektion. Danach wurden die Mäuse auf einer Wärmematte gelagert, um ein Auskühlen zu verhindern, bis sie aus der Narkose erwachten. Nun wurden die Tiere wieder in einen Käfig gesetzt, und je nach zugeteilter Gruppe für weitere 1, 3 oder 7 Tage gehalten. Es wurde jeden Tag nachgeschaut, dass es den Tieren gut ging, und ob genug Futter und Wasser vorhanden war. Der Belastungszustand der Tiere wurde anhand von „score sheets“ zwei mal täglich bewertet und dokumentiert. Hierbei zeigte sich am Abend des Operationstages meist eine gering bis mittelgradige Belastung und bereits nach 24h eine nun noch geringe Belastung.

Die Operation erfolgte unter sauberen aber nicht sterilen Bedingungen.

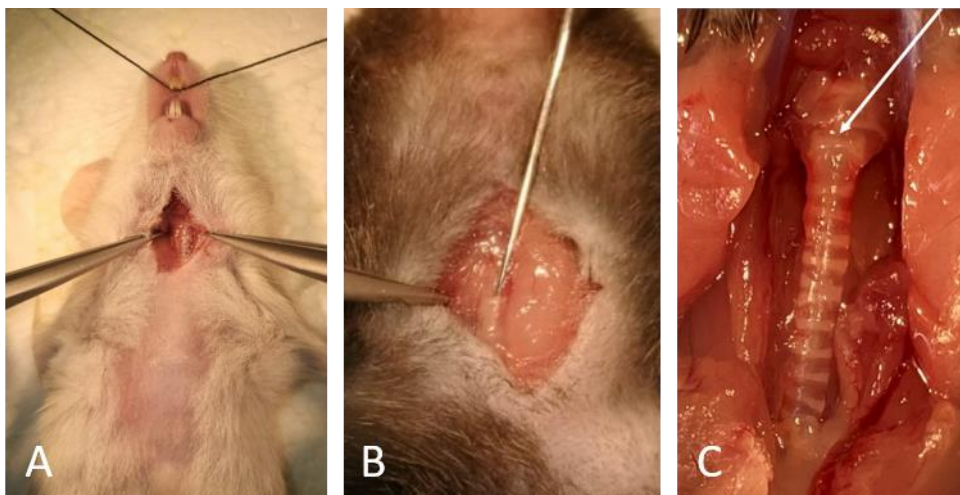


Abbildung 2.1: Durchführung der Operation. Fixierung der narkotisierten Maus auf einer Halterung (A). Freilegen der Trachea und Denatoniuminjektion durch das Ligamentum cricothyroideum medianum (B). Darstellung der Trachea ex vivo, Pfeil zum Lig. Cricothyroideum medianum (C)

2.8 Gewebegewinnung

2.8.1 Perfusion und Präparation der Organe

Die Tötung der Mäuse erfolgte durch eine Überdosis Isofluran (1 ml/Maus) per inhalationem in einer verschlossenen Kammer. Nach Feststellung der Abwesenheit des Stellreflexes, des Zwischenzehenreflexes und der stattgehabten Schnappatmung (und somit letztlich des Exitus), wurde die Maus auf einer Styroporplatte fixiert und die Präparation wurde begonnen. Mit einer Präparierschere wurde zunächst die Bauchdecke eröffnet und ohne das Peritoneum zu verletzen (um die Bauchorgane nicht zu verletzen) median in Richtung Sternum präpariert. Daraufhin wurde das

Peritoneum eröffnet, der Darm «ausgelagert» und die Leber aus ihrer Nische luxiert, mit dem Ziel freien Blick von kaudal auf das Zwerchfell zu erlangen. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass die Leber später zur Kontrolle des Erfolgs der Perfusion herangezogen wurde. Das Zwerchfell wurde nun rechtsseitig seitlich entlang der Rippen aufgeschnitten, wodurch die Lungen kollabieren, und dann vollständig abgesetzt. Die Rippen wurden möglichst weit lateral mit einer Schere durchtrennt und somit der freie Blick auf die intrathorakalen Organe ermöglicht. Somit war dann die Präparation des Herzens möglich. Im Rahmen der Herzpräparation wurde zunächst der rechte Vorhof eröffnet (zum Ausbluten der Maus), dann erfolgt eine Injektion von 0,2 ml Heparin in den linken Ventrikel und schließlich eine kleine Inzision in den linken Ventrikel, um eine stumpfe Kanüle einführen zu können. Die Schwierigkeit hierbei ist, das interventrikuläre Septum nicht zu durchbrechen, damit es zu keiner direkten Perfusion des Lungenkreislaufs kommt. Hierdurch würden unter Umständen die Zellen aus der Lunge und später auch aus der Trachea weggespült. Darum galt es dies zu vermeiden. Nach erfolgreichem Einführen der Kanüle in den linken Ventrikel wurde mit einer Vorspüllösung (PVP) das Gefäßsystem über die Kanüle gespült. Sobald die Flüssigkeit aus dem rechten Vorhof nicht mehr blutig war und die Leber heller erschien, wurde das PVP auf die Fixierungslösung umgestellt (Zamboni). Die Fixierung wurde dann solange fortgesetzt bis die Leber sich gelb färbte und Schwanz und Extremitäten steif wurden, jedoch mindestens für 15 min. Im Anschluss wurde die Maus entweder bis zur Präparation der Organe bei 4°C gelagert (höchstens wenige Stunden) oder sofort unter dem Mikroskop präpariert.

2.8.2 Präparation

Zur Präparation und Entnahme der Organe wurde die Maus wiederum auf einer Styroporplatte in Rückenlage fixiert. Durch die Perfusion war der Thorax bereits eröffnet. Es erfolgte zunächst die Präparation der Trachea. Hierzu musste diese natürlich dargestellt werden. Dabei war auf die Intaktheit des anliegenden Ösophagus zu achten, da dieser später zur «Aufhängung» des Thoraxpakets (Herz, Lunge, Thymus) in dem Reaktionsgefäß für die Waschvorgänge genutzt wurde. Sobald die Trachea dargestellt war, wurden die Knorpelspannen vom Kehlkopf ausgehend gezählt (also ab der ersten Spange kaudal der cartilago cricoidea). Wir resezierten und konservierten die Trachea in 3 Abschnitte unterteilt (Kehlkopf und 1.-4. Knorpelspanne, 5.-8. Knorpelspanne, und 9.-12. Knorpelspanne) um eine bessere Unterscheidung zwischen Entzündung durch den Einstich (im Bereich der 1.-4. Spange) und neurogener Entzündung (5.-8. Spange) zu ermöglichen. Die entnommenen Tracheaabschnitte wurden zunächst für eine Stunde in mit Zamboni gefüllten Mikroreaktionsgefäßen belassen. Das Zamboni wurde dann durch 0,1-molaren Phosphatpuffer ersetzt und dieser fortan ca. 3-mal täglich gewechselt bis die Lösung nicht mehr gelblich erschien. Nach der Entnahme der Trachea erfolgte die Entnahme des Thoraxpakets. Hierzu wurde zunächst der Ösophagus mit einem Faden umschlungen und festgeknotet, infolge dessen man den Ösophagus kranial des Fadens durchtrennen konnte. Zur Lösung der Organe vom knöchernen Thorax empfahl

es sich nun leicht am Faden nach ventral kaudal zu ziehen, und eventuelle Verwachsungen mit der Thoraxwand sowie den Oesophagus und die Vena cava inferior vorsichtig zu durchtrennen. Das Thoraxpaket wurde dann für 12 Stunden in einem 50 ml-Falcon (Polypropylen Röhrchen) mit Zamboni belassen. Nach 12 Stunden wurde die Zamboni-Lösung durch 0,1-molaren Phosphatpuffer ersetzt und ebenfalls fortan täglich ca. 3-mal gewechselt, bis die Lösung klar blieb, insgesamt bedeutete dies 4-5 Tage.

2.9 Behandlung der Gewebe

2.9.1 Waschen

Sobald die Gewebe (Trachea, Lungen und Herz) fertig gewaschen waren, begannen wir mit den Vorbereitungen für die Konservierung, dem Einbetten. Dies beinhaltete zunächst das Anfertigen einer 18-prozentigen Saccharose-Lösung in 0,1-molarem Phosphatpuffer. In dieser Lösung ließ man die Gewebe nun über Nacht ruhen, um einen Schutz vor Gefrierschäden, durch Kristallbildung des Wassers z.B. zu gewährleisten. Am Folgetag konnte das Gewebe eingebettet werden.

2.9.2 Einbetten

Da wir zur Bestimmung der Zellen immunhistochemische Färbungen durchführten und sich aus Erfahrungswerten gezeigt hatte, dass dies besser an kryokonservierten Geweben funktionierte, betteten wir die Gewebe nicht in Paraffin ein, sondern in einem speziellen Medium. Die spätere Lagerung erfolgte bei -80 °C.

Das Einbettmedium TissueTek wurde in kleine Kunststoffformen gefüllt, wobei bereits darauf geachtet werden sollte, keine Luftblasen zu verursachen, da diese beim Schockgefrieren Risse in Blöckchen und Gewebe provozieren können. Die Gewebe wurden dann aus den Mikroreaktionsgefäßen und Falcons entnommen und in das TissueTek gelegt. Auch hierbei wurde streng darauf geachtet, keine Luftblasen zu erzeugen. Zudem war es wichtig, dass das Gewebe komplett von TissueTek bedeckt wurde.

Die Förmchen wurden dann in Methylbutan getaucht, welches durch flüssigen Stickstoff stark heruntergekühlt wurde (Trachea 5-6 sec. eintauchen; Thoraxpaket ca.7-8 sec. eintauchen, nach Bedarf mit TissueTek entstandene Defekt ausbessern, dann wiederum 2-3 sec. eintauchen; es wurde vermieden die Gewebe mehrmals einzutauchen, um zu verhindern, dass sich das tracheale Epithel von der Lamina propria ablöst. Um ein zu starkes Aufwärmen des gefrorenen Gewebes zu verhindern, wurden die Förmchen im Anschluss für ca. 30 min im Kryostaten bei -20 °C aufbewahrt. Bei diesen niedrigen Temperaturen wurden die Blöckchen dann auf Filterpapier geklebt (mit TissueTek) und das Filterpapier beschriftet. Mit Parafilm eingewickelt, wurden die Blöckchen dann bei -80 °C gelagert.

Um eine optimale Ausrichtung des Gewebes für das spätere Schneiden am Kryostaten zu ermöglichen, wurde in dieser Arbeit das Einbetten stets von demjenigen durchgeführt, der später auch die Schnitte anfertigte.

2.10 Herstellung von Kryoschnitten

Die bei -80 °C eingefrorenen Gewebe wurden mit einem Kryostat (Leica CM 1950) alle nach demselben Prinzip geschnitten. Geschnitten wurde bei einer Kryostat-Raumtemperatur von -22 °C und einer Objekttemperatur von -20 °C.

Bei der Trachea wurde nur das mittlere entnommene Segment (Knorpelspannen 5-8) in der Transversalebene geschnitten und ausgewertet. Es wurden Schnittserien angefertigt wie in Abb. 2.2 gezeigt. Der Abstand zwischen zwei Schnitten auf einem Objektträger betrug demnach immer 200 µm. Auf einen Objektträger wurden 5 Schnitte aufgenommen.

Die Lungen wurden nach demselben Prinzip in der Frontalebene geschnitten (um auch die Verästelung des Bronchialbaumes darstellen zu können); hier wurden jedoch nur 2 Schnitte pro Objektträger aufgenommen.

2.11 Immunhistochemie

Zur Darstellung spezifischer Proteine verschiedener Zellen wurde die Methode der Immunhistochemie verwandt. Hierbei wurden die zu untersuchenden Gewebe mit Antikörpern inkubiert, welche an der variablen Domäne spezifisch für das gesuchte Merkmal sind.

Die Schnitte von 10 µm respektive 30 µm (zur Darstellung der dendritischen Zellen) Dicke wurden mit einem Kryostaten angefertigt. In der Folge wurden die Lungenschnitte 1,5 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet, die Tracheaschnitte 1 Stunde. Je nach Antikörper/Epitop wurden verschiedene Techniken angewandt, um eine bessere Bindung der Antikörper zu ermöglichen. Die entsprechenden Techniken sind Tabelle 2.2 zu entnehmen.

Bei der Permeabilisierung handelt es sich um ein Verfahren, bei welchen Detergenzien eingesetzt werden, um Poren in Zellmembranen zu schaffen. In der vorliegenden Arbeit wurden die Schnitte zur Färbung mit bestimmten Antikörpern (Tab. 2.2) in 0,3%igem Triton X 100 in PBS für 30 min geschwenkt, dann 10 min in PBS gewaschen.

Die Antigendemaskierung ist ein Methodenkomplex, anhand dessen man die Intensität immunhistochemischer Färbungen verbessern kann. Ich verwende hier den Begriff «Methodenkomplex», da es zahlreiche verschiedene Methoden gibt solch eine Demaskierung vorzunehmen (enzymatisch, chemische Denaturierung, Hitzebehandlung) (Yamashita 2007). In dieser Arbeit wurde ein Protokoll der Hitzebehandlung befolgt. Demnach wurden die Schnitte in Citronensäure (pH 3 und 6) oder EDTA-TRIS-Puffer (pH 6 und 9) für 10 min in der Mikrowelle bei voller Leistung gekocht, dann auskühlen gelassen und letztlich nochmals in PBS gewaschen. Es

wurden alle pH-Werte ausprobiert, da zuvor beschrieben wurde, dass sich die Proteine bei unterschiedlichen pH-Werten auch unterschiedlich verhalten: beim Erhitzen werden Methylenbrücken gespalten und Polypeptidketten exponieren ihre hydrophoben Regionen. Beim Abkühlen können sich die Polypeptide wieder zusammenfalten. Hierbei sind die verschiedenen pH-Werte wichtig: bei pH 3 und 9 scheinen hydrophobische Anziehung und elektrostatische Abstoßung sich so die Waage zu halten, dass es kaum zu Verflechtungen der Proteine kommt. Bei pH 6 jedoch, scheinen ionische und hydrophobische Kräfte zusammenzuwirken, und so eine Verwirrung der Polypeptide und somit der Antigene zu begünstigen (Yamashita 2007). Die Berechtigung auch bei Oberflächenproteinen eine Antigendemaskierung zu versuchen, sehen die Autoren darin, dass auch diese von benachbarten Proteinen «bedeckt» sein können. Alternativ zur Mikrowellenbehandlung wurde die Wärmeenergie anhand eines auf 97 °C aufgeheizten Ofens aufgebracht, in welchem die Schnitte in dem jeweiligen Puffer für 30 min erhitzt wurden.

Nach eventueller Vorbereitung, wie oben beschrieben, wurden die Schnitte mit einem Fettstift umrandet, um ein Übertreten der Flüssigkeiten zu verhindern. Es folgte das einstündige Blocken mit einer Blockierungslösung, welches den Zweck hat, eine unspezifische Bindung von Antikörpern oder anderen Substanzen an das Gewebe zu vermeiden. Dies ist auch bei Antikörpern mit hoher Spezifität zum Antigen nötig. Daraufhin wurde die Blockierungslösung abgesaugt und das Gewebe mit dem Primärantikörper (in jeweiliger Konzentration in PBS-S angesetzt) in einer befeuchteten Kammer inkubiert für eine Dauer von ca. 12 Stunden (über Nacht). Die Verdünnung der Antikörper ist Tabelle 2.2 zu entnehmen.

Am nächsten Tag folgte das Waschen der Objektträger in 1x PBS für 3-mal 10 min, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Somit sind die Objektträger mit den Geweben bereit für die Inkubation mit den Sekundärantikörpern (Verdünnung in Tab. 2.3 angegeben); diese erfolgte für 1 Stunde wiederum in einer befeuchteten Kammer, in dunkler Lagerung diesmal da die Sekundärantikörper photosensibel sind. Im Anschluss erfolgte eine weitere Waschung in 1xPBS für 3-mal 10 min. Um die DNA und somit die Zellkerne besser darzustellen wurde dann eine 10-minütige Färbung mit DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol, welches an die kleine Furche der DNA bindet, bevorzugt an AT-reichen Stellen (Wilson W. 1990)) durchgeführt. Es folgte eine erneute Waschung für 3-mal 10 min in 1xPBS und anschließend eine Fixation für 10 min in 4% PFA. Dies erfolgte unter dem Abzug. Nach einer letzten Waschung für 3-mal 10 min in 1xPBS wurden die Schnitte eingedeckt, hier mit Mowiol in der Regel. Um die Fluoreszenz FITC-gekoppelter Antikörper zu verbessern, wurden die entsprechenden Objektträger mit gepuffertem Glycerol eingedeckt; um das Mikroskopieren zu erleichtern, wurden hierbei die Ecken der Objektträger mit handelsüblichem Nagellack versiegelt.

Für negativ-Kontrollen wurde anstelle des Primärantikörpers mit reinem PBS-S inkubiert. Der restliche Vorgang ist identisch.

2.12 Auswertung

2.12.1 Trachea-Schnitte

Bei der Trachea wurde nur das mittlere entnommene Segment (Knorpelspannen 5-8) geschnitten und ausgewertet. Es wurden Schnittserien angefertigt wie in Abb. 2.2 für die Lungenschnitte gezeigt; aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde eine solche Abbildung für Tracheaschnitte nicht angefertigt. Der Abstand zwischen zwei Schnitten auf einem Objektträger betrug demnach immer 200 μm .

Die Zählung der verschiedenen Zellen in der Trachea wurde für jeden Schnitt einzeln unter dem Fluoreszenzmikroskop durchgeführt und dokumentiert. Es wurden für jeden Antikörper pro Tier 5 Schnitte ausgewertet. Statistisch ausgewertet wurden letztlich die Zahl der neutrophilen Granulozyten, dendritischen Zellen und der Bürstenzellen. Das Vorkommen der durch die anderen Antikörper (Tab. 2.2) markierten Epitope wurde qualitativ analysiert. Von der Arbeitsgruppe von Professor Flockerzi aus dem Institut für klinische und experimentelle Pharmakologie der Universität des Saarlandes erhielten wir einen Antikörper gegen den TRPM5-Kanal (TRPM5-794 affi): zur primären Identifizierung der TRPM5-positiven Bürstenzellen in Wildtypen wurden die Tracheaschnitte mit diesem Antikörper gefärbt. Um die Bürstenzellen auch bei den TRPM5^{-/-}-Mäusen darzustellen, war ein anderer Bürstenzellmarker nötig. Hierzu wurde ein Antikörper gegen die double-cortin-like Kinase (DCAMKL1) genutzt, welche auch in Nervenfasern zu finden ist. Die Trachea-Schnitte wurden in Hinblick auf dendritische Zellen mit CD11c als Marker (Manicone et al. 2009) und auf neutrophile Granulozyten mit Ly6G als Marker (Logu et al. 2017) ausgezählt.

Zur Darstellung des Komplementsystembestandteils C3 in der Trachea wurde dieser mittels Immunhistochemie dargestellt (siehe Tab. 2.2). Um eine möglichst objektive Beurteilung zu ermöglichen, wurden die Schnitte in einem Arbeitsgang gefärbt, natürlich mit derselben Verdünnung des Antikörpers, und mit der gleichen Belichtungszeit im Cy3-Kanal fotografiert. Bei einer Verdünnung des Antikörpers von 1:3200 in PBS-S wurde bei 10-facher Objektivvergrößerung mit 400 ms Belichtungszeit fotografiert und bei 20- und 40-facher Objektivvergrößerung mit 160 ms in Cy3. Dies wurde so festgelegt, dass bei den Kontroll-Geweben nur ein minimales Signal sichtbar war. Zur Quantifizierung wurde dann eine Fläche von 5000 μm^2 auf dem trachealen Epithel und der Lamina propria umrandet und die mittlere Cy3-Fluoreszenz-Intensität gemessen.

2.12.2 Lungen-Schnitte

Die Lungen wurden nach demselben Prinzip (Abb. 2.2) geschnitten, hier wurden aufgrund der Größe des Organs 2 Schnitte pro Objektträger aufgenommen.

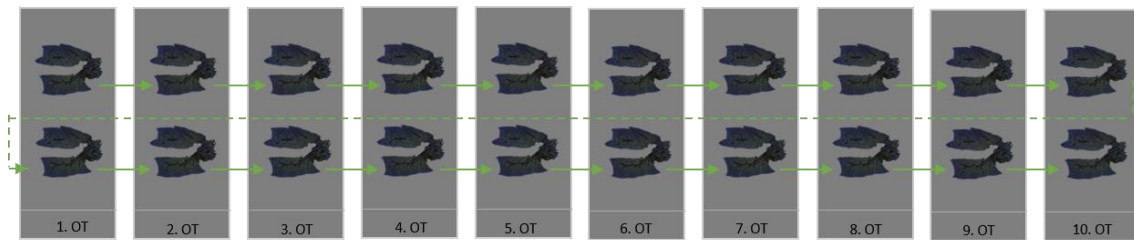


Abbildung 2.2: Schnittreihe der Lunge. Hier sind 10 Objektträger dargestellt, es wurden jedoch so viele Objektträger geschnitten, wie es unter Einhaltung der 200 µm Abstand zwischen zwei Schnitten eines Objektträgers möglich war.

Bei der Färbung der Schnitte wurden verschiedene Antikörper genutzt, und die Ergebnisse qualitativ und/oder quantitativ ausgewertet (Tab. 2.2).

Wie auch die Tracheen wurden die Lungenschnitte mit einem Marker (Ly6G) für neutrophile Granulozyten gefärbt und die positiven Zellen gezählt und statistisch ausgewertet.

B-Lymphozyten wurden in der Lunge mit einem Antikörper gegen CD45R/B220 (George et al. 1994; Hathcock et al. 1992) und T-Lymphozyten mit einem CD3-Antikörper (Bahmani et al. 2018; Solleti et al. 2016) gefärbt. Die Schnitte wurden wie unten beschrieben gescannt und ausgezählt.

Die Zählung der neutrophilen Granulozyten, B-Lymphozyten und T-Lymphozyten in der Lunge wurde anhand von eingescannten (Axio Scan.Z1, AG Prof. Ulrich Böhm, experimentelle Pharmakologie, und AG Prof. Kirchhoff, molekulare Physiologie, Universität des Saarlandes) Lungenschnitten durchgeführt. Die generierten Bilder wurden mit einem Gitter überlagert im Bildbearbeitungsteil des Programms (Zen 2.3, Image processing). Mithilfe dieses Gitters wurden dann einzelne Felder ausgezählt. Hierbei wurde nach einem konkreten Muster vorgegangen: gezählt wurde jedes 6. Feld (nur in Reihen mit mindestens 6 Feldern), wenn 2 Felder in Folge zu mehr als der Hälfte aus Luft/Bronchus bestanden wurde das zweite übersprungen und das nächste Feld gezählt, insgesamt wurden 40 Felder pro Tier gezählt. Die Größe eines solchen Feldes betrug $312.130 \mu\text{m}^2$ ($686 \times 455 \mu\text{m}$). Lungenflügel, welche zu klein waren, um nach den beschriebenen Kriterien gezählt zu werden, wurden nicht ausgezählt und gingen nicht mit in die Auswertung ein, da solche Schnitte offenbar an zu peripheren Stellen der Lunge entstanden sind und somit nicht vergleichbar wären. Um Veränderungen der Immunaktivität in der Lunge darzustellen, wurden zunächst die neutrophilen Granulozyten ausgezählt. Zellen wurden in der Auswertung aufgenommen, wenn der Zellkern angeschnitten war. Die Entscheidung, ob es sich um einen neutrophilen Granulozyten handelt, wurde wesentlich anhand der Kernfärbung durch DAPI getroffen. In Abb. 2.3 soll beispielhaft dargestellt werden, welche Zellen als Neutrophile erachtet wurden und welche nicht.

Das selbe Vorgehen wurde bei den B- und T-Lymphozyten angewandt.

Bei den T-Lymphozyten war die Anzahl an gezählten Kästchen 12 Kästchen pro Tier gezählt, sodass pro Gruppe 48 Werte ermittelt wurden. Dadurch war eine gute statistische Auswertung möglich.

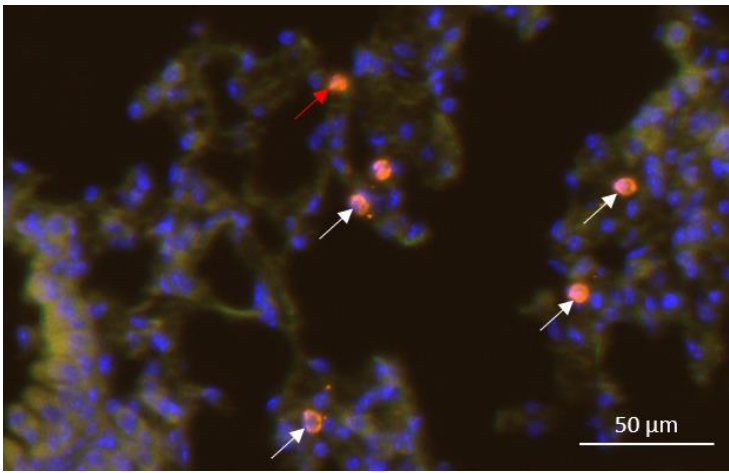


Abbildung 2.3: Beispielhafte Darstellung von gezählten (weiße Pfeile) bzw. nicht gezählten (rote Pfeile) Neutrophilen Granulozyten anhand eines Ausschnittes eines Lungen-Scans.

2.13 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe des Programms GraphPad Prism 8. Die Daten wurden zunächst auf Normalverteilung überprüft anhand des Kolmogorov-Smirnov-Tests oder Shapiro-Wilk-Tests. Normalverteilte Werte wurden dann mit einem One-Way ANOVA-Test auf signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen überprüft, gefolgt von Dunnett's multiplen Vergleich-Tests. Hierbei wurden nur die interessierenden Vergleiche errechnet, um die Genauigkeit zu verbessern. Nicht normalverteilte Werte wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test auf signifikante Unterschiede geprüft. Der direkte Vergleich zwischen zwei einzelnen Gruppen erfolgte bei normalverteilten Datensätzen anhand des ungepaarten t-Tests und als non-parametrische Alternative anhand des Mann-Whitney-Tests. $P \leq 0.05$ wurde als statistisch signifikant erachtet.

Um Ausreißer aufzudecken wurde zunächst der ROUT-Test mit $Q=1\%$ durchgeführt. Die Werte für die Korrelationsanalyse wurden pro Tier gemittelt und dann den entsprechenden Tieren zugeordnet. Ein Ausreißer wurde der Spezifität wegen mittels Grubbs Test ($\alpha=0,05$) identifiziert.

Die Korrelationsanalysen wurden mithilfe von IBM SPSS Statistics 26 durchgeführt. Hierzu wurden zunächst verschiedene Merkmale definiert (Tab. 2.7).

Merkmals	Ausprägungen	Skalenniveau	
Maus-Nummer	1-39	Nominal	Qualitativ
Intervention	1, 3, 7d, Den., Vehikel- u. Kontrollgruppe	Nominal	Qualitativ
Bürstenzell-Zahl	Zellen / Tracheating	Metrisch/stetig	Quantitativ
Neutrophilen-Zahl	Zellen / Tracheating	Metrisch/stetig	Quantitativ
Zahl der dendr. Zellen	Zellen / Tracheating	Metrisch/stetig	Quantitativ

Tabelle 2.7: Übersicht über die Untersuchten Merkmale, deren Ausprägungen und ihr Skalenniveau

Zunächst sollte ein korrelativer Zusammenhang zwischen der Anzahl an Bürstenzellen und der Anzahl an neutrophilen Granulozyten untersucht werden. Es wurden alle vorhandenen Daten zu den insgesamt 39 Versuchstieren miteinbezogen. Pro Tier wurden ursprünglich 5 Werte für jeden Zelltyp erhoben. Um die Analyse hier übersichtlicher zu gestalten wurden diese 5 Werte für jedes Tier

gemittelt. Fehlende Daten wurden mit einem Punkt gekennzeichnet, und flossen nicht in die Auswertung mit ein. Hierbei wurde die Anzahl der neutrophilen Granulozyten als abhängige Variable definiert und die Anzahl der Bürstenzellen als unabhängige Variable. Bei beiden Variablen handelt es sich um eine metrische und dementsprechend quantitative Variable.

Um eine Übersicht über die Anzahl der Tiere pro Versuchsgruppe zu geben wurde Tabelle 2.8 erstellt.

Gruppe		Anzahl	Anzahl als Spalten (%)	
Gruppe	WT OE	3	7,7%	
	KO OE	3	7,7%	
	WT 1d PBS	3	7,7%	
	KO 1d PBS	3	7,7%	
	WT 1d DEN	5	12,8%	
	KO 1d DEN	6	15,4%	
	WT 3d DEN	4	10,3%	
	KO 3d DEN	4	10,3%	
	WT 7d DEN	4	10,3%	
	KO 7d DEN	4	10,3%	
	Gesamt		39	100,0%

Tabelle 2.8: Gruppen-Verteilung der Versuchstiere (OE: Organentnahme, keine Vorbehandlung der Tiere)

Des Weiteren erfolgte eine deskriptive Statistik sowie eine bivariate Analyse mittels Streudiagramm. Gegebenenfalls wurde nachfolgend eine lineare Regression mit Berechnung des Korrelationskoeffizienten nach Pearson auf einem Signifikanzniveau von 0,01 (2-seitig) durchgeführt.

Im Folgenden werden den üblichen Standards entsprechend nicht signifikante ($p > 0,05$) Unterschiede mit „ns“ gekennzeichnet, Unterschiede mit einem p-Wert $\leq 0,05$ mit „*“, Unterschiede mit einem p-Wert $\leq 0,01$ mit „**“ und Unterschiede mit einem p-Wert $\leq 0,001$ mit „***“. Nicht signifikante Unterschiede zwischen Gruppen werden nur dann mit „ns“ gekennzeichnet, wenn dies von besonderer Relevanz ist. Ansonsten werden sämtliche, in den entsprechenden Abbildungen darzustellende, signifikanten Unterschiede wie oben beschrieben gekennzeichnet. Eine fehlende Kennzeichnung bedeutet also, dass hier kein signifikanter Unterschied besteht.

3. Ergebnisse

Die Tracheen wurden histologisch ausgewertet wobei besonderer Wert auf die Qualität der Schnitte gelegt wurde. Bei den angefertigten Serienschnitten in oben beschriebener Technik erzielte ich Tracheaschnitte mit durchgehend am Stroma anliegendem Epithel (siehe Abb. 3.1, A). Diese Strukturintegrität ist die Voraussetzung für eine adäquate Zählung der verschiedenen Zelltypen. Eine Übersicht der für die vorliegende Arbeit relevanten Strukturen ist in Abb. 3.1 zusammengefasst.

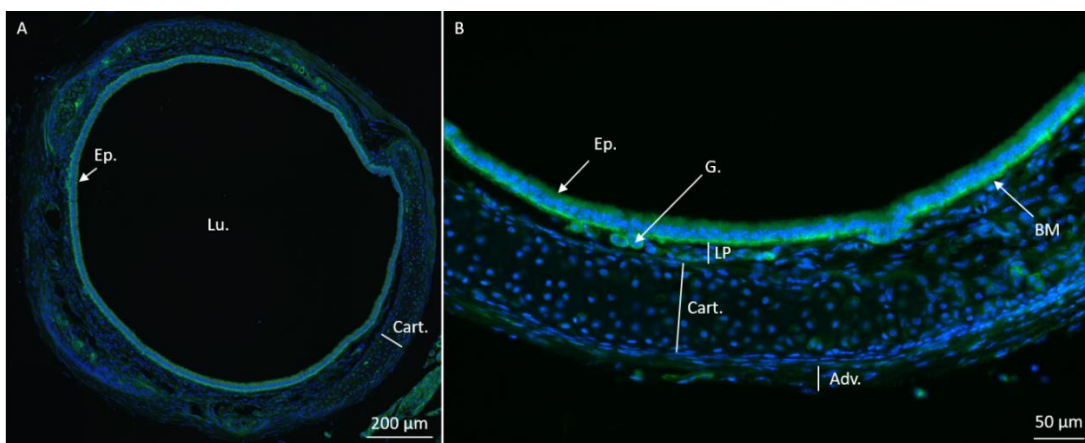


Abbildung 3.1: Trachea-Schnitt mit IHC gegen Lectin in 5-facher (A) und 20-facher (B) Vergrößerung. Lu.: Lumen. Ep.: Epithel. G.: Gefäß. BM: Basalmembran. LP: Lamina propria. Cart.: Cartilago trachealis. Adv.: Adventitia

3.1 Zahl der Bürstenzellen in der Trachea

Um Veränderungen der Bürstenzellzahl zu erkennen, wurden die Tracheaschnitte immunhistochemisch behandelt (Abb. 3.2). Diese Färbungen dienen als Grundlage für die weiter unten aufgeführten quantitativen Ergebnisse.

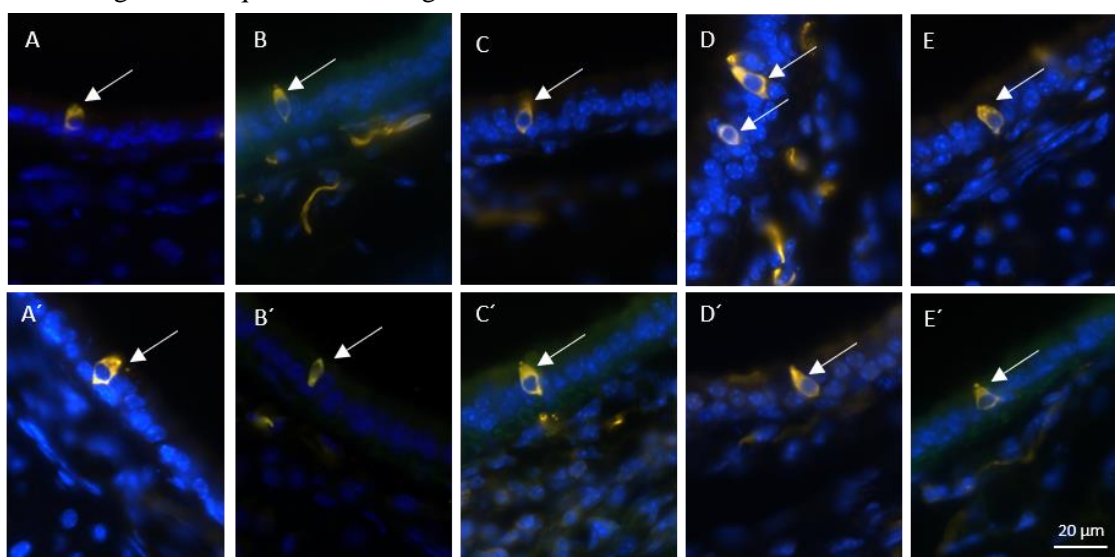


Abbildung 3.2: Immunhistochemie der Tracheen aller Gruppen, DCAMKL1 (gelb, Cy3) und DAPI (blau). A-E: TRPM5^{+/+}, A'-E': TRPM5^{-/-}. Von A-E bzw. von links nach rechts sind Bürstenzellen folgender Gruppen abgebildet: Kontrollgruppe, Vehikelgruppe, 1d Denatonium (Den.), 3d Den., 7d Den.. Pfeile: Bürstenzellen. Die Bürstenzellen konnten in allen Gruppen mit einer ähnlichen Morphologie dargestellt werden.

Um die Zählung der Bürstenzellen auch bei den TRPM5^{-/-}-Tieren zu ermöglichen, wurden die Schnitte mit einem DCAMKL1-Antikörper gefärbt.

Anfangs wurden Schnitte beider Mausstämmen mit einem Antikörper gegen den TRPM5-Kanal gefärbt, wobei sich das erwartete Ergebnis zeigte. Die TRPM5^{-/-}-Tiere wiesen keine Immunreaktivität auf den in Tab. 2.2 genannten Antikörper auf, während bei den TRPM5^{+/+}-Tieren Bürstenzellen klar zu identifizieren waren (Abb. 3.3).

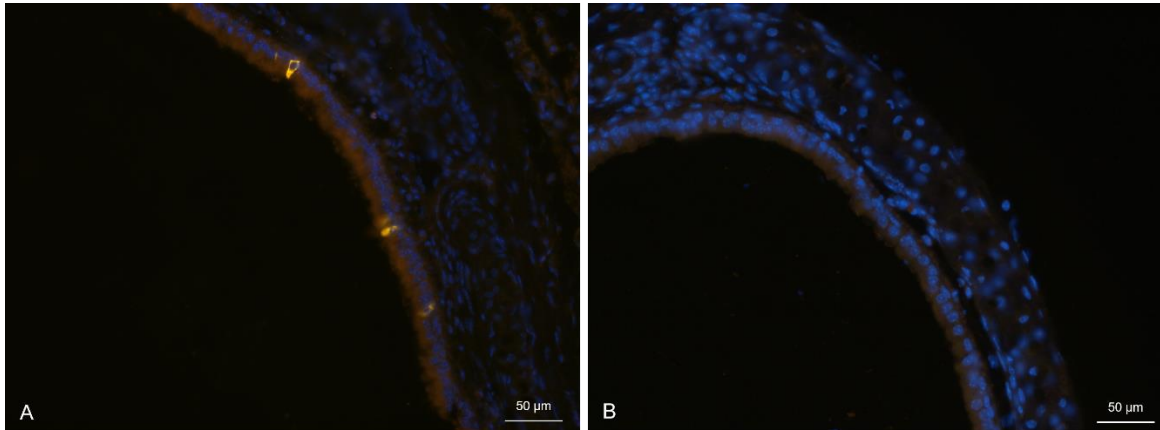


Abbildung 3.3: Immunhistochemie mit dem TRPM5-794-Antikörper (affinitätsgereinigt, V. Flockerzi), Trachea (Maus). A. TRPM5^{+/+}-Tier mit positiven Bürstenzellen in gelb. B. TRPM5^{-/-}-Tier ohne Fluoreszenz nach der Färbung mit demselben Antikörper.

3.1.1 Vergleich der TRPM5^{+/+}- und TRPM5^{-/-}-Tiere

Die Werte der Bürstenzellzählungen in der Trachea wurden zunächst mithilfe des Shapiro-Wilk-Tests auf Normalverteilung geprüft. Hierbei zeigte sich eine Normalverteilung in allen Versuchsgruppen. Daher wurde die weitere Analyse mit dem One-way-ANOVA Test und Dunnett's multiple comparisons test fortgeführt.

Im direkten Vergleich der TRPM5^{+/+}-Tiere und der TRPM5^{-/-}-Tiere zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Mausstämmen am jeweiligen Tag (Abb. 3.4).

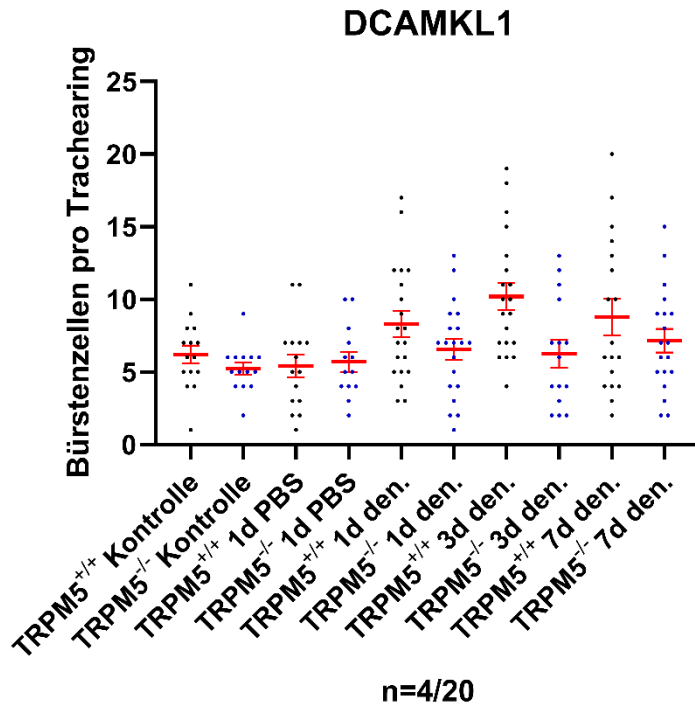


Abbildung 3.4: Auftragung der Einzelwerte der DCAMKL1-positiven Zellen pro Trachearing, alle Versuchsgruppen. Dunnett's multiple Vergleichstests mit $p < 0,05$ als signifikant.

Zunächst interessierte uns, ob die alleinige operative Maßnahme mit reiner Vehikelinhalation (ohne Denatonium) zu einer Veränderung der Bürstenzellzahl führt. Weder bei den TRPM5^{-/-}-Tieren noch bei den Wildtypen konnte ein signifikanter Unterschied ($p > 0,999$ jeweils) zwischen der reinen Kontrollgruppe ohne jegliche Maßnahme und der Vehikelgruppe gezeigt werden (Abb. 3.5).

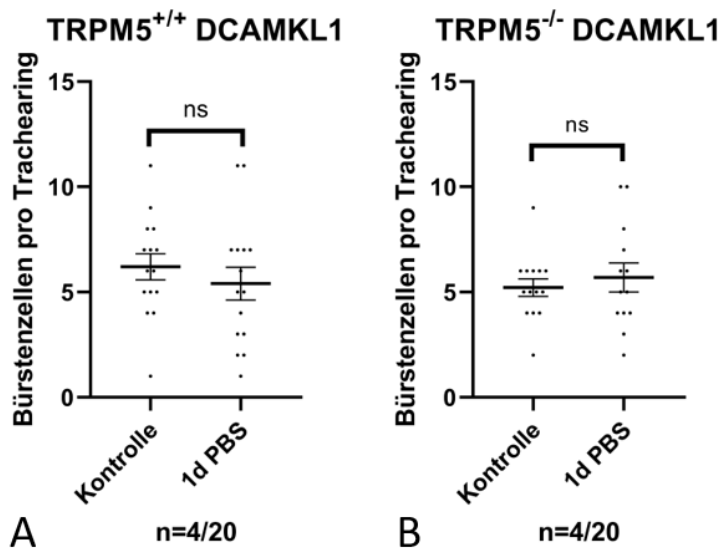


Abbildung 3.5: Keine Auswirkung der reinen Vehikelinhalation auf die Bürstenzellzahl der Trachea

3.1.2 Zeitlicher Verlauf bei TRPM5^{+/-}-Tieren

Bei den Wildtypen wurde ein signifikanter Unterschied ($p=0,0064$) zwischen der Gruppe mit reiner Vehikelgabe und der Denatonium-3-Tages-Gruppe (Abb. 3.6, A) festgestellt. Dieser Unterschied verdeutlicht die Zunahme der Anzahl an Bürstenzellen (um 89% nach 3 Tagen im Vergleich zur Vehikelgruppe) bei den Wildtypen über 3 Tage hinweg. Zwischen der 1-Tages-Denatoniumgruppe und der 3-Tages-Denatoniumgruppe selbst fand sich kein signifikanter Unterschied ($p=0,8376$). Am 7. Tag blieb die Zahl der Zellen unverändert zum Tag 3 ($p=0,9746$).

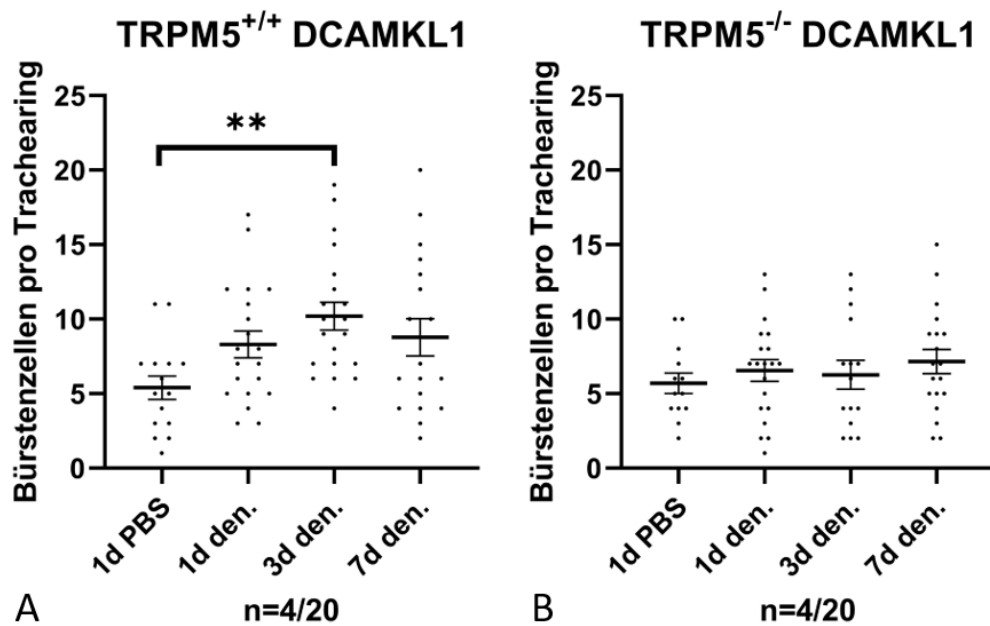


Abbildung 3.6: zeitlicher Verlauf der Anzahl an Bürstenzellen bei (A) TRPM5^{+/-}- und (B) TRPM5^{-/-}-Tieren

3.1.3 Zeitlicher Verlauf bei TRPM5^{-/-}-Tieren

Im Gegensatz zu den Wildtypen fand sich kein Anstieg in der Anzahl der Bürstenzellen am 3. Tag nach Stimulation im Vergleich zur Vehikelgabe ($p>0,999$) (Abb. 3.6, B). Hier wurde zwischen keiner der Gruppen ein signifikanter Unterschied gefunden. Die Vehikelgruppe unterschied sich nicht signifikant von der 1-Tages-Denatoniumgruppe ($p=0,9997$) sowie von der 7-Tages-Denatoniumgruppe ($p=0,9845$).

3.2 Zahl der neutrophilen Granulozyten in der Trachea

3.2.1 Immunhistochemische Darstellung der neutrophilen Granulozyten

Um einen wichtigen Parameter der neurogenen Entzündung zu erforschen, wurden die neutrophilen Granulozyten im trachealen Gewebe dargestellt (Abb. 3.7).

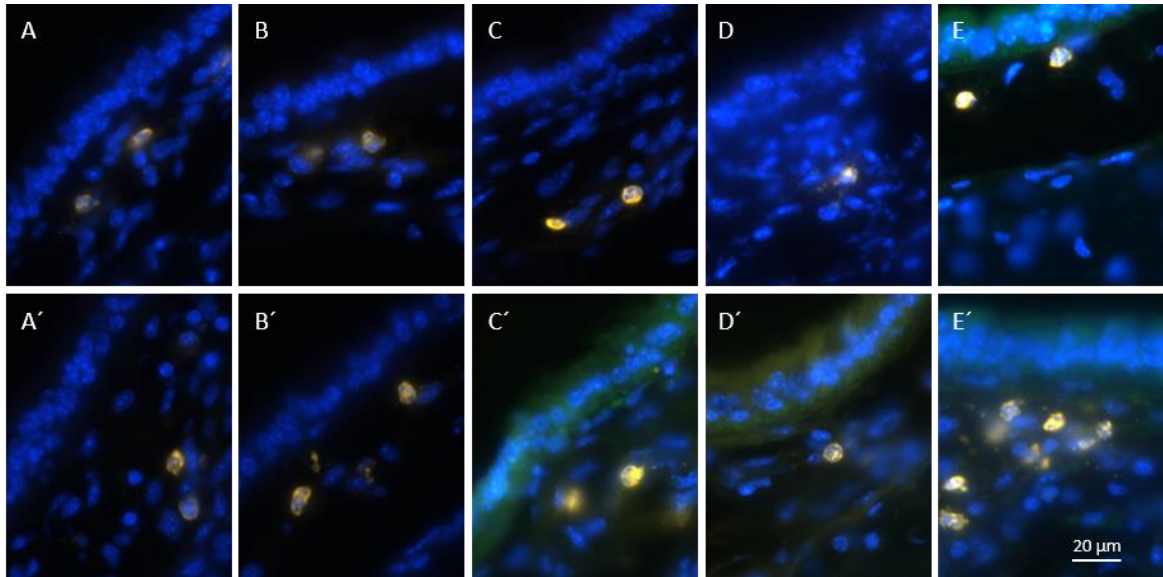


Abbildung 3.7: Markierung von Ly6G (gelb, Cy3) auf Trachea-Schnitten, DAPI (blau). A-E: TRPM5^{+/+}, A'-E': TRPM5^{-/-}. Von links nach rechts sind respektive folgende Gruppen abgebildet: Kontrollgruppe, Vehikelgruppe, 1d Den., 3d Den., 7d Den.. Auffällig ist hier die annähernde Abwesenheit von Neutrophilen in den 3-Tages-Gruppen (D und D').

In der Kontrollgruppe und Vehikelgruppe war kein merklicher Unterschied zwischen TRPM5^{-/-}-Tieren und Wildtypen zu sehen (vgl. Abb. 3.7 und 3.8). Ein Tag nach Denatoniuminjektion war ein leichter, statistisch jedoch nicht relevanter Anstieg in der Zahl der Neutrophilen zu beobachten, und zwar bei beiden Mausstämmen. Besonders auffällig war der starke Abfall der Neutrophilen-Zahlen nach drei Tagen, welcher ebenfalls bei beiden Mausstämmen zu beobachten war, statistisch jedoch etwas stärker ausgeprägt bei den TRPM5^{+/+}-Mäusen. An Tag 7 ist ein starker erneuter Anstieg der Neutrophilen-Zahlen besonders bei den TRPM5^{-/-}-Mäusen zu vermerken, in geringerer Ausprägung jedoch auch bei den TRPM5^{+/+}-Mäusen.

3.2.2 Vergleich der TRPM5^{+/+}- und TRPM5^{-/-}-Tiere

Zunächst wurden die Werte der Neutrophilenzählungen auf Normalverteilung geprüft. Nach dem Kolmogorov-Smirnov-Test und dem Shapiro-Wilk-Test waren nur die Kontrollgruppe, die Vehikelgruppe und die 7-Tages Gruppe des TRPM5^{-/-}-Mausstamms normalverteilt. Aus diesem Grund wurde der Kruskal-Wallis-Test gefolgt von Dunnett's multiplen Vergleichstests durchgeführt (Abb. 3.8). Zudem wurde eine Ausreißer-Analyse mittels ROUT- und Grubbs-Test durchgeführt. 5 Ausreißer-Werte wurden identifiziert und als solche markiert. Zwischen den Kontrolltieren beider Mausstämme zeigte sich kein signifikanter Unterschied ($p > 0,999$), ebenso bei den Tieren der Vehikelgruppe ($p > 0,999$). Des Weiteren bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Mausstämmen ein Tag nach Denatoniuminhalation ($p = 0,0707$). Nach 3 Tagen fanden sich bei den TRPM5^{-/-}-Tieren 61% mehr Neutrophile als bei den Wildtypen ($p > 0,999$ in Dunnett's Test) und nach 7 Tagen fanden sich nahezu 100% mehr Neutrophile bei den TRPM5^{-/-}-Tieren ($p > 0,999$ in Dunnett's Test). Nach 3 ($p = 0,0424$) und 7 ($p = 0,0125$) Tagen zeigte sich aber im direkten Vergleich mittels

Mann-Whitney-Test ein signifikanter Unterschied zwischen den TRPM5^{-/-}-Tieren und den Wildtypen.

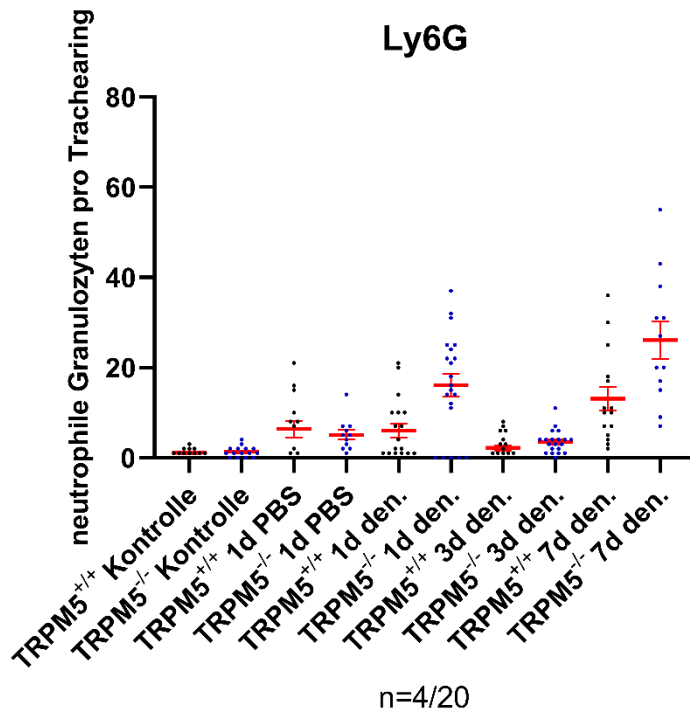


Abbildung 3.8: Vergleich der Anzahl an neutrophilen Granulozyten aller Versuchsgruppen. Dunnett's multiple Vergleichstests mit $p < 0,05$ als signifikant.

Wie auch bei der Auswertung der Bürstenzellzahlen interessierte uns hier die potenzielle Auswirkung der operativen Maßnahme und der Vehikelinhalation auf die Entstehung einer neurogenen Entzündung in der Trachea. Hier zeigte sich, dass kein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe nach einer reinen Organentnahme und der Vehikel-behandelten Gruppe besteht (Abb. 3.9).

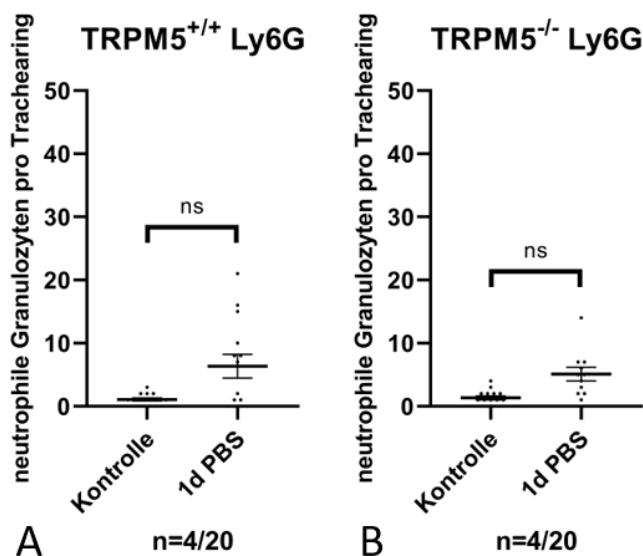


Abbildung 3.9: Quantifizierung der neutrophilen Granulozyten in der Trachea. Keine Auswirkung der reinen operativen Maßnahme auf die Zahl der neutrophilen Granulozyten in der Trachea.

3.2.3 Zeitlicher Verlauf bei TRPM5^{+/+}-Tieren

Außer dem Vergleich zwischen den Mausstämmen wurden ebenfalls die verschiedenen Versuchsgruppen innerhalb eines Mausstamms, hier den TRPM5^{+/+}-Tieren (Abbildung 3.10 A), miteinander verglichen. Hierbei fand sich zwischen den Denatoniumgruppen und der Vehikelgruppe kein Unterschied (1 Tag Den.: $p > 0,999$, 3 Tage Den.: $p > 0,999$, 7 Tage Den.: $p = 0,8084$).

Ein signifikanter Unterschied ($p = 0,0018$) in Dunnett's multiplen Vergleichstests besteht zwischen der 3-Tages und der 7-Tages Gruppe. Am siebten Tag finden sich annähernd sechs Mal so viele Neutrophile wie am dritten Tag.

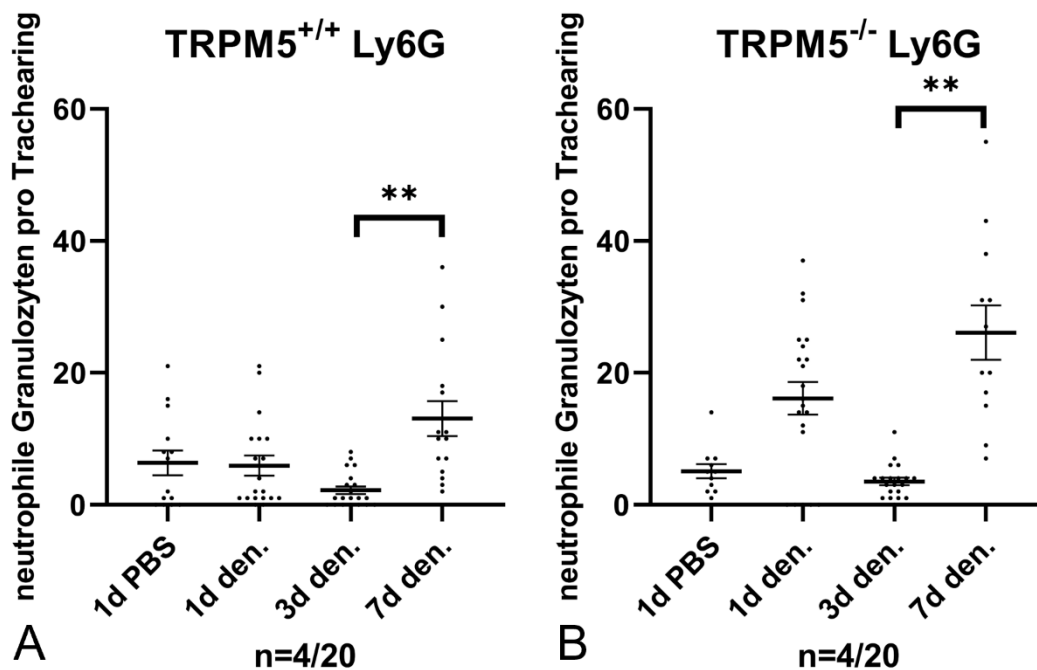


Abbildung 3.10: zeitlicher Verlauf der Anzahl an neutrophilen Granulozyten bei (A) TRPM5^{+/+}- und (B) TRPM5^{-/-}-Tieren.

3.2.4 Zeitlicher Verlauf bei TRPM5^{-/-}-Tieren

Bei den TRPM5^{-/-}-Tieren wurden besonders gegen Ende des Versuchsaufbaus mehr Neutrophile rekrutiert als bei den Wildtypen. Nach sieben Tagen fanden sich bei den TRPM5^{-/-}-Tieren im Mittel doppelt so viele neutrophile Granulozyten in der Trachea wie bei den TRPM5^{+/+}-Tieren. Es bestand kein Unterschied zwischen der Vehikelgruppe und der 1-Tages-Denatonium-Gruppe ($p > 0,999$), ebenso wie im Vergleich der Vehikelgruppe mit der 3- ($p > 0,999$) und 7-Tages-Denatonium-Gruppe ($p = 0,2148$).

Es fand sich hier ebenso wie bei den Wildtypen ein signifikanter Unterschied ($p = 0,003$) in Dunnett's Vergleichstests zwischen der 3-Tages und der 7-Tages Gruppe.

3.3 Zahl der dendritischen Zellen in der Trachea

3.3.1 Immunhistochemische Darstellung der dendritischen Zellen

Dendritische Zellen spielen essentielle Rollen im Immunsystem der Atemwege, weshalb auch ihr Vorhandensein untersucht wurde. Allgemein konnte eine vermehrte Ansammlung der dendritischen Zellen im Bereich des Paries membranaceus beobachtet werden. Ansonsten zeigte sich eine größere Anzahl an dendritischen Zellen besonders in den 1- und 3-Tages Denatoniumgruppen, während die Kontrollgruppen die geringste Zahl an CD11c-positiven Zellen aufwiesen.

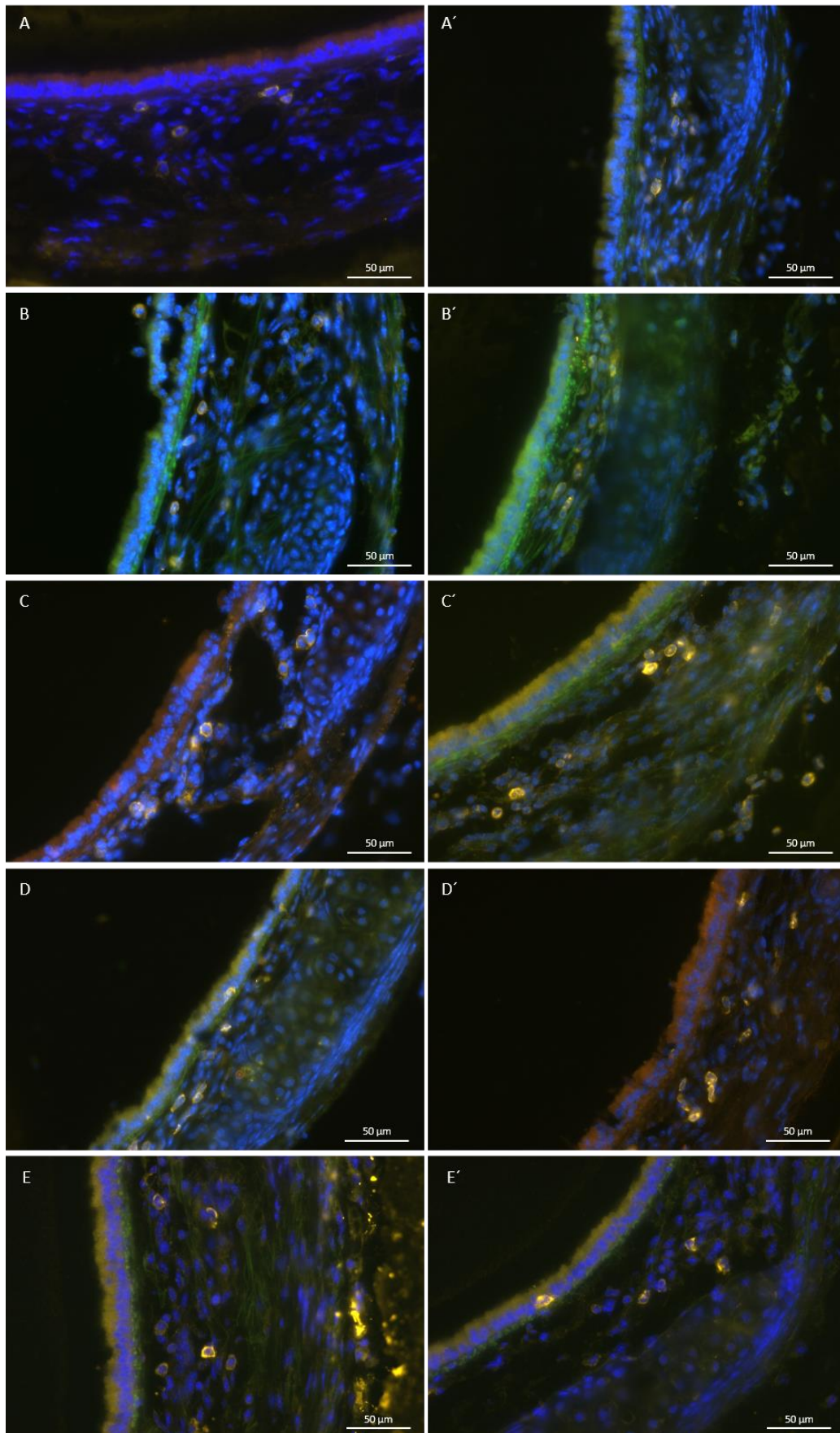


Abbildung 3.11 Darstellung der dendritischen Zellen (CD11c-positiv, gelb, Cy3); DAPI (blau) und GFP-Autofluoreszenz (grün). A-E: TRPM5^{+/+}-Tiere. A'-E': TRPM5^{-/-}-Tiere. A-A': Kontrollgruppe. B-B': Vehikelgruppe. C-C': 1d-Den.-Gruppe. D-D': 3d-Den.-Gruppe. E-E': 7d-Den.-Gruppe.

3.3.1 Vergleich der TRPM5^{+/+}- und TRPM5^{-/-}-Tiere

Die Werte der Zählung wurden auf Ausreißer mittels Grubb's Test analysiert. Ein Wert wurde als Ausreißer identifiziert und in Prism als solcher gekennzeichnet. Die nachfolgende Analyse auf Normalverteilung mithilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests sowie des Shapiro-Wilk-Test zeigte eine Normalverteilung bei allen Versuchsgruppen. Daher wurde die Analyse mit einem One-Way ANOVA und Dunnett's multiplen Vergleichstest fortgeführt.

Es zeigte sich bei keiner der Gruppen ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Mausstämmen (Abb. 3.12). Anders sah es im t-Test aus: hier zeigt sich ein signifikanter Unterschied in der Anzahl an dendritischen Zellen zwischen den 1-Tages-Denatonium-Gruppen beider Mausstämme ($p=0,032$). Sowohl bei den TRPM5^{+/+}-Mäusen als auch bei den TRPM5^{-/-}-Tieren stieg die Zahl der dendritischen Zellen im Verlauf, und fiel zwischen Tag 3 und Tag 7 wieder ab.

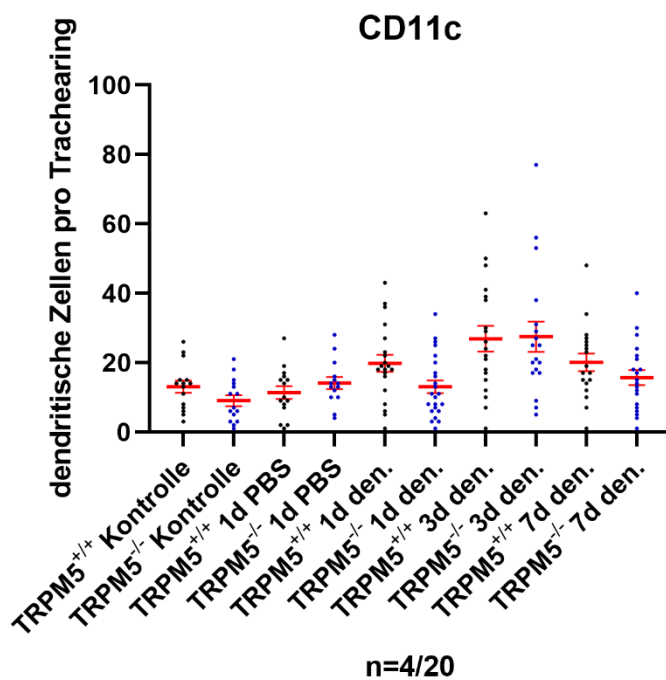


Abbildung 3.12: Auftragung der Einzelwerte der CD11c-positiven Zellen pro Trachearing, alle Versuchsgruppen. Dunnett's multiple Vergleichstests mit $p<0,05$ als signifikant.

Da bei der Übersichtsdarstellung und dem direkten Vergleich der beiden untersuchten Mausstämmen in den jeweiligen Gruppen keine merklichen Unterschiede auftraten, ist die Auswertung des zeitlichen Verlaufs der Mausstämmen einzeln nun umso wichtiger.

Hier zeigte sich weder bei den Wildtypen noch bei den TRPM5^{-/-}-Tieren ein signifikanter Unterschied (Abb. 3.13) zwischen der Kontrollgruppe und der Vehikelgruppe.

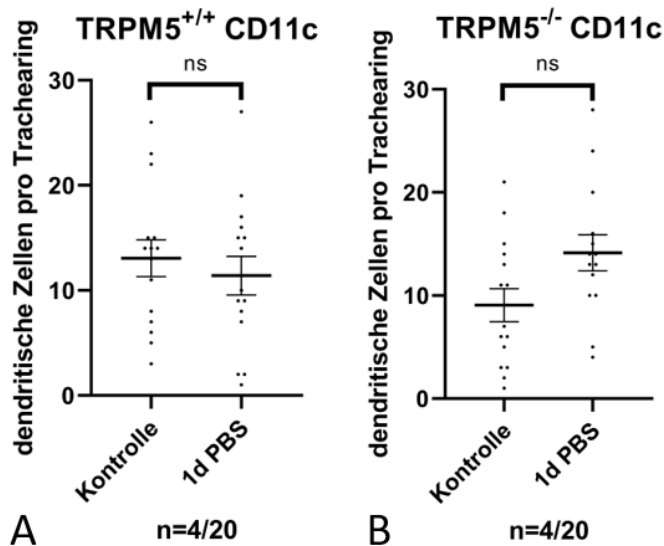


Abbildung 3.13: Keine Auswirkung der reinen operativen Maßnahme auf die Zahl der dendritischen Zellen in der Trachea

3.3.2 Zeitlicher Verlauf bei TRPM5^{+/+}-Tieren

Es konnte ein signifikanter Unterschied ($p = 0,0451$) zwischen der Vehikelgruppe und der 3-Tages Denatoniumgruppe festgestellt werden (Abb. 3.14). Nach drei Tagen finden sich in der Tat im Mittel 136% mehr dendritische Zellen als ein Tag nach Vehikelinhalation. Zwischen der Vehikelgruppe und der 1-Tages-Denatoniumgruppe ($p=0,8519$) bzw. der 7-Tages-Denatoniumgruppe ($p=0,8142$) konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. Im direkten Vergleich mittels t-Test fanden sich ausgeprägtere Signifikanzen. So besteht ein Unterschied zwischen der Vehikelgruppe und der 3-Tages- ($p=0,002$) und 7-Tages-Denatonium-Gruppe ($p=0,012$).

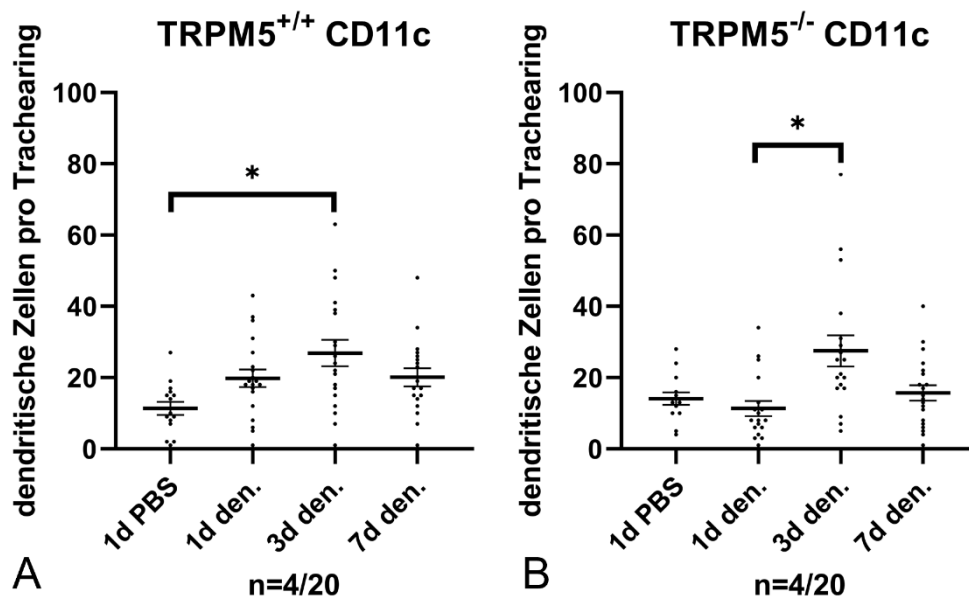


Abbildung 3.14: zeitlicher Verlauf der Anzahl an dendritischen Zellen bei (A) TRPM5^{+/+}- und (B) TRPM5^{-/-}-Tieren

3.3.3 Zeitlicher Verlauf bei TRPM5^{-/-}-Tieren

Die Zunahme der dendritischen Zellen zwischen der Vehikelgruppe und der 3-Tages Denatoniumgruppe war hier, im Gegensatz zu den Wildtypen, nicht signifikant ($p = 0,6034$). Im t-Test hingegen zeigt sich auch hier ein Unterschied zwischen Vehikel- und 3-Tages-Denatonium-Gruppe ($p=0,016$). So zeigten sich auch in der genaueren Betrachtung 94% mehr dendritische Zellen in der 3-Tages-Gruppe als in der Vehikelgruppe. Zwischen der Vehikelgruppe und der 1-Tages-Denatoniumgruppe ($p>0,999$) bzw. der 7-Tages-Denatoniumgruppe ($p>0,999$) konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. Zwischen der 1-Tages- und 3-Tages-Denatoniumgruppe hingegen konnte ein schwach signifikanter Unterschied nachgewiesen werden (Abb. 3.14, B. und $p=0,0496$).

3.4 Weitere Immunzellen in der Trachea: Makrophagen und B-Lymphozyten

3.4.2 B-Lymphozyten in der Trachea

Bei der Färbung der Lungen mit dem Antikörper gegen CD45R, mit welchem in der vorliegenden Arbeit die B-Lymphozyten dargestellt wurden, fielen besonders perihilär stark positive Lymphknoten auf (Abb. 3.15). Diese können als positiv-Kontrolle für diese Färbungen dienen.

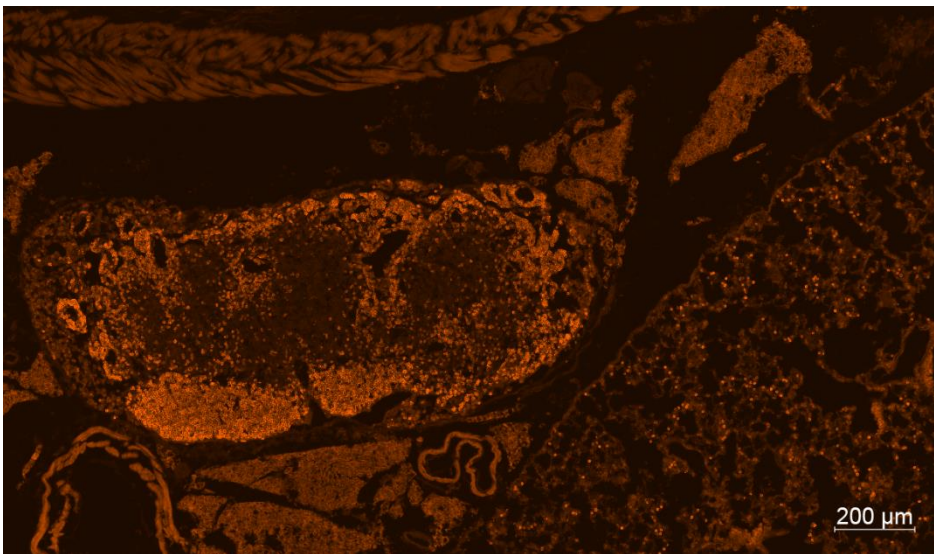


Abbildung 3.15: perihilärer Lymphknoten, Antikörper gegen CD45R (Cy3, orange)

Es zeigte sich anhand von Färbungen mittels CD45R-Antikörper eine geringe Anzahl von B-Lymphozyten in den Trachea-Schnitten aller untersuchten Gruppen. Leicht vermehrt schienen die B-Lymphozyten auf den Schnitten der Wildtyp-Tiere sieben Tage nach Inhalation von Denatonium. Es wurden nirgends follikelartige Ansammlungen von B-Lymphozyten gesehen. Aufgrund der sehr geringen Anzahl von B-Lymphozyten in der Trachea über alle Gruppen hinweg wurde von einer statistischen Auswertung abgesehen.

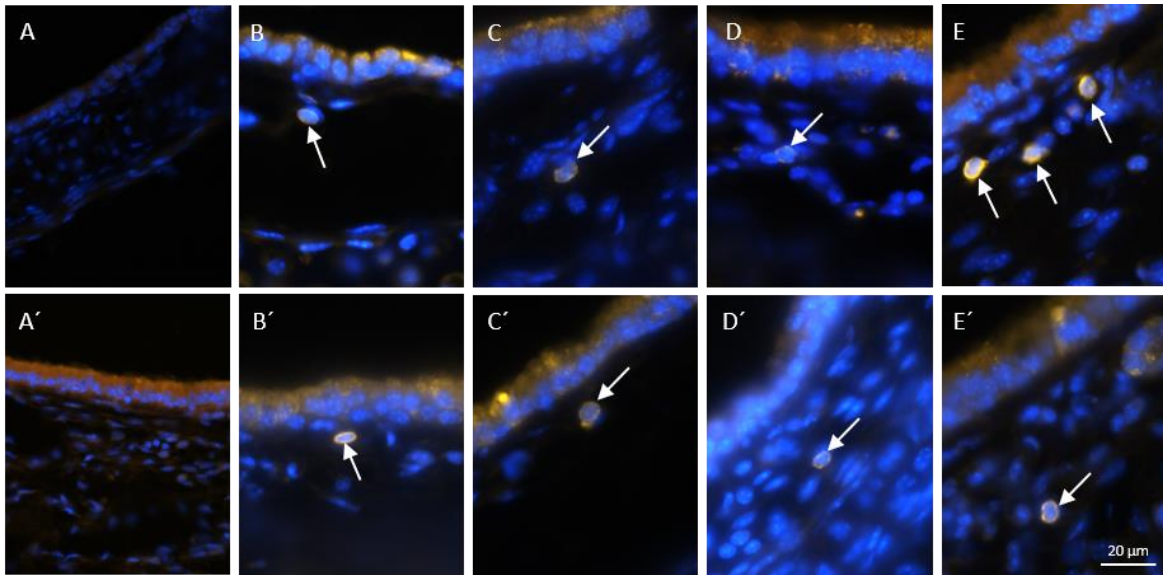


Abbildung 3.16: IHC an Trachea-Schnitten beider Mausstämme. CD45R in Cy3 (gelb) und DAPI (blau). A-E: TRPM5^{+/+}-Tiere. A'-E': TRPM5^{-/-}-Tiere. A-A': Kontrollgruppe. B-B': Vehikelgruppe. C-C': 1d-Den.-Gruppe. D-D': 3d-Den.-Gruppe. E-E': 7d-Den.-Gruppe. Auffällig ist die höhere Anzahl an B-Lymphozyten bei dem Wildtyp der 7-Tages-Gruppe.

3.4.3 Makrophagen in der Trachea

Es wurde primär versucht, Makrophagen mithilfe des klassischen Makrophagen-Markers F4/80 zu markieren. Hierbei gab es Schwierigkeiten hinsichtlich der Antikörper-Qualität einer neuen Antikörpercharge. In Abbildung 3.17 ist der Vergleich zwischen dem alten und dem neuen Lot zu sehen. Bei beiden Färbungen wurden die Gewebeschnitte vergleichbar behandelt.

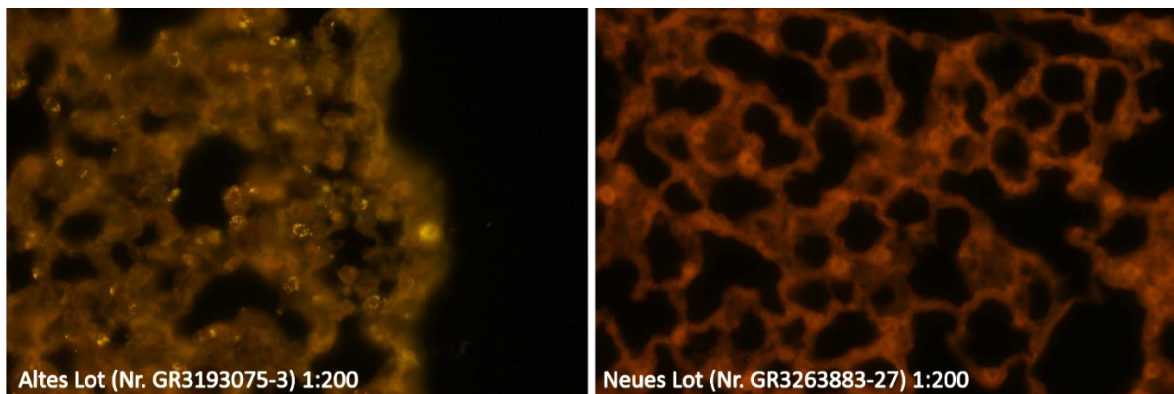


Abbildung 3.17: Lunge, ICH mit F4/80-Antikörper aus der früheren Charge (links) und aus der neueren Charge (rechts)

In Anbetracht dieser Umstände war eine weitere Färbung und Auswertung des Makrophagen-Vorkommens nicht möglich.

3.5 Der Komplementsystembestandteils C3 in der Trachea

Das Komplementsystem interessierte uns als Teil des Immunsystems und Verknüpfungsstelle von angeborener und erworbener Immunantwort. Daher wurde eine qualitative und quantitative Beurteilung von immunhistochemisch gefärbten Schnitten (Abb. 3.18) durchgeführt.

Ein Tag nach Denatoniuminhalation war, im Vergleich zu dem entsprechenden TRPM5^{-/-}-Gewebe, bei dem untersuchten TRPM5^{+/+}-Gewebe ein stärkeres Signal ($p < 0,001$, blaue Raute in Abb. 3.19) im Bereich der Basalmembran zu sehen. Auch konnte bei den TRPM5^{+/+}-Tieren eine signifikant ($p < 0,001$) stärkere C3-Aktivierung nach Denatoniuminhalation gefunden werden, verglichen mit der Vehikelinhalation.

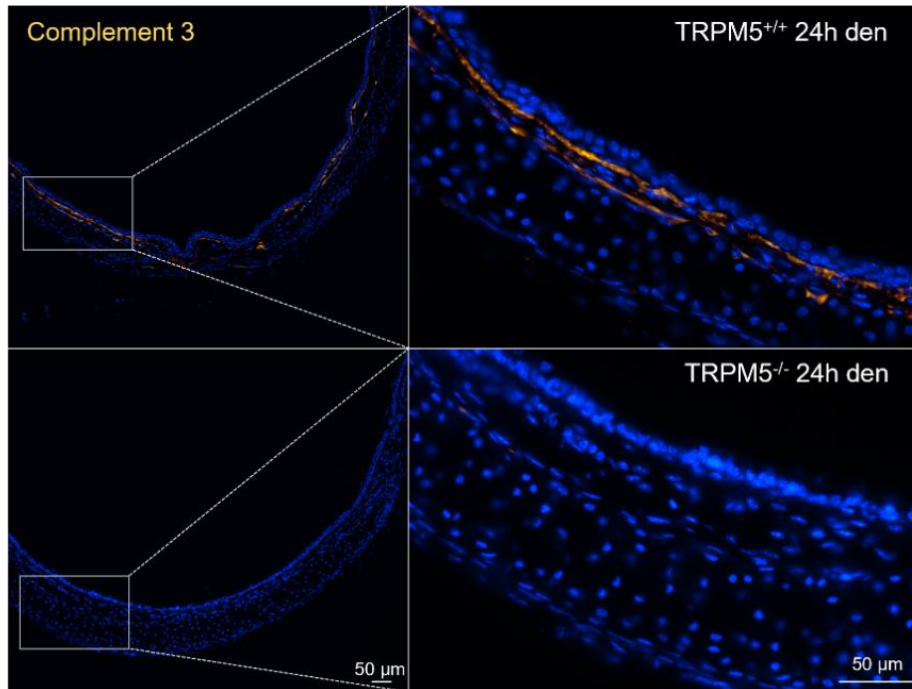


Abbildung 3.18: Auswertung der Aktivität des Komplement-Faktors C3 (gelb) in der Trachea: eine immunhistochemische Darstellung. Bei den TRPM5^{+/+}-Tieren ist die Fluoreszenz im Bereich der Basalmembran stärker ausgeprägt als bei den TRPM5^{-/-}-Tieren.

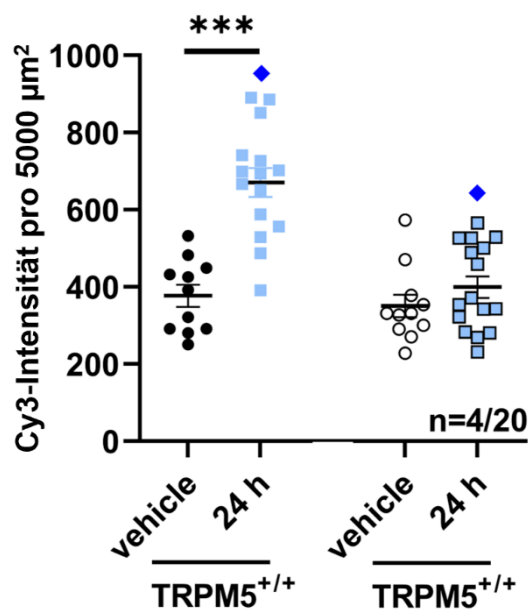


Abbildung 3.19: Auswertung der Aktivität des Komplement-Faktors C3 (gelb) in der Trachea: eine mikroskopische Quantifizierung. Es zeigte sich eine stärker ausgeprägte C3-Aktivität bei den TRPM5^{+/+}-Tieren (blaue Raute: signifikanter Unterschied zwischen den TRPM5^{+/+}- und TRPM5^{-/-}-Tieren mit $p < 0,001$).

3.6 Prüfung der Ergebnisse auf Korrelationen

Um herauszufinden, ob ein genereller Zusammenhang zwischen der Anzahl an Bürstenzellen und der Anzahl an Immunzellen in der Trachea besteht, wurde mithilfe des Programms SPSS eine Korrelationsanalyse durchgeführt.

Die Nullhypothese, dass die Injektion von Denatonium keine Auswirkung auf die Bürstenzell-Zahl in der Trachea hat, wurde bereits oben abgelehnt (siehe Kapitel 3.1).

3.6.1 Zusammenhang zwischen Bürstenzellen und neutrophilen Granulozyten

In der Folge wurden anhand einer deskriptiven Statistik die Lage- und Streuungsmaße ermittelt. Hierbei ergab sich ein Mittelwert von 7,64 Bürstenzellen und von 8,71 Neutrophilen pro Trachea-Ring. Da es sich bei beiden Variablen um quantitative Variablen handelt, wurde in der Folge ein bivariate Analyse mittels Streudiagramm durchgeführt.

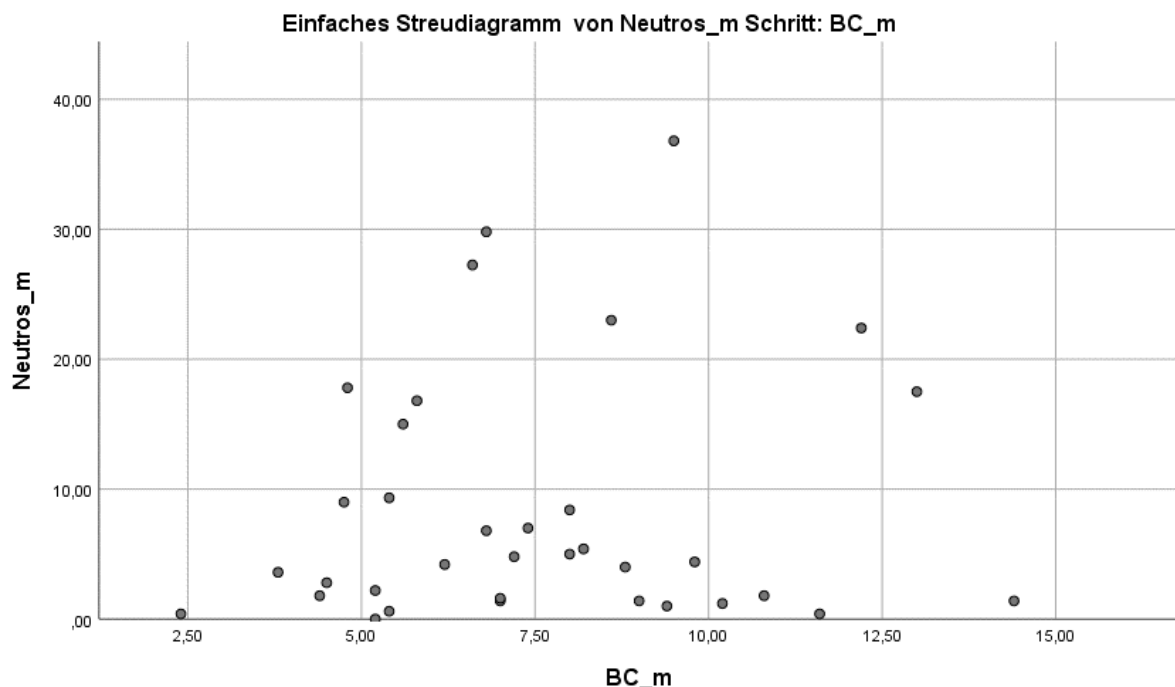


Abbildung 3.20: Streudiagramm der Anzahl der neutrophilen Granulozyten (Neutros_m) in Bezug auf die Anzahl an Bürstenzellen (BC_m) pro Trachearing

Im Streudiagramm zeigte sich keine offensichtliche lineare oder anderweitige Korrelation. Um dies zu überprüfen wurde des Weiteren der Korrelationskoeffizient nach Pearson berechnet. Bei dieser Analyse wurde kein linearer Zusammenhang ermittelt (Korrelationskoeffizient nach Pearson = 0,106).

3.6.2 Zusammenhang zwischen der Anzahl an Bürstenzellen und der Zahl an dendritischen Zellen

Es interessierte des Weiteren, ob eine vermehrte Zahl an Bürstenzellen im trachealen Epithel mit einem höheren Vorkommen an dendritischen Zellen korreliert. Der Mittelwert der dendritischen Zellen lag bei 16,35 Zellen pro Trachea-Ring

Für die weitere Auswertung wurde aufgrund der quantitativen Eigenschaften beider Merkmale erneut ein Streudiagramm erzeugt. Ein Wert wurde als Ausreißer identifiziert und als solcher im Programm SPSS gekennzeichnet.

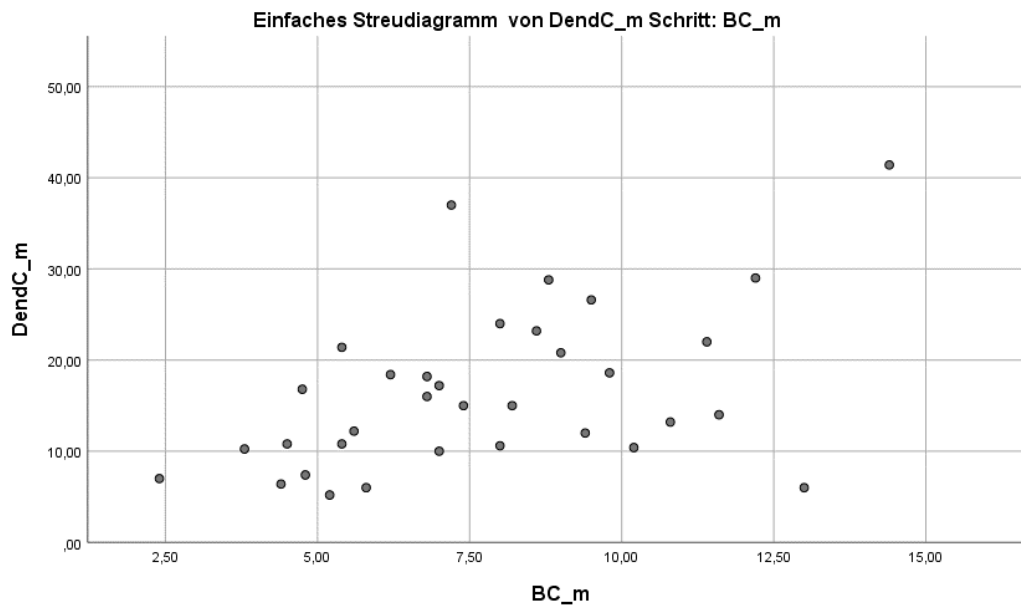


Abbildung 3.21: Streudiagramm der Anzahl der dendritischen Zellen (DendC_m) in Bezug auf die Anzahl an Bürstenzellen (BC_m) pro Trachearing

In dem Streudiagramm zeigte sich eine Tendenz zu einer positiven Korrelation. Es wurde dementsprechend der Korrelationskoeffizient nach Pearson ausgerechnet.

Dieser betrug 0,481 auf einem Signifikanzniveau von 0,01 (2-seitig), was einem positiven linearen Zusammenhang entspricht. In der Konsequenz wurde dann eine lineare Regression durchgeführt.

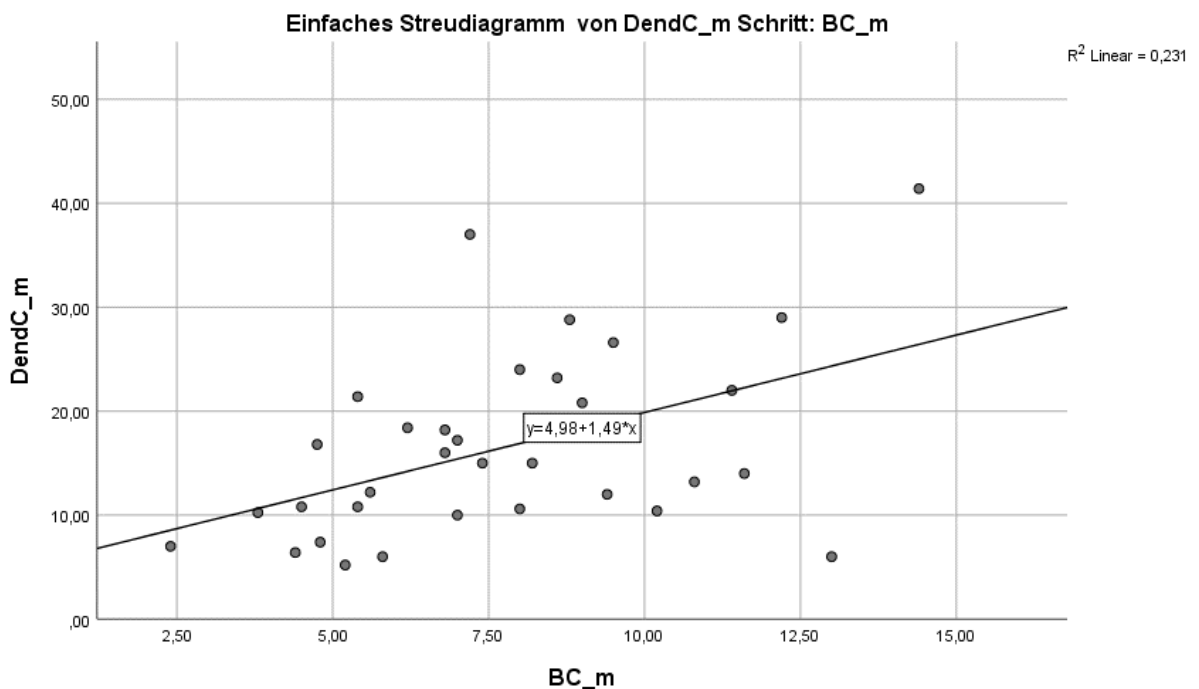


Abbildung 3.22: Streudiagramm mit linearer Regression

Es konnte eine Gerade gebildet werden, mit der Formel $y=4,98 + 1,49 * x$.

Der Achsenabschnitt liegt also bei 4,98 und die Steigung bei 1,49. Daraus ergibt sich für den untersuchten Wertebereich, dass wenn sich die Anzahl der Bürstenzellen um 1 Bürstenzelle pro Trachearing erhöht, sich die Anzahl der dendritischen Zellen um 1,49 pro Trachearing erhöht. Es handelt sich hierbei um eine Korrelation und nicht um eine Kausalität.

3.7 Neutrophile in der Lunge

3.7.1 Immunhistochemische Darstellung der neutrophilen Granulozyten in der Lunge

Neutrophile Granulozyten sind besonders in der Lunge wichtige sogenannte „first responder“ (Aulakh 2018). Daher interessierte uns ihr Vorkommen in der Lunge, mit möglichen Veränderungen in Folge der Denatoniuminhalation. Um dies zu untersuchen, wurden wiederum immunhistochemische Färbungen der Lungenschnitte aller Versuchsgruppen angefertigt (Abb. 3.23). Hierbei fielen Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen auf, insbesondere zwischen den beiden Mausstämmen ein Tag nach Denatoniuminhalation (Abb. 3.23 vgl. C und C'). Um diesen Unterschied statistisch auszuwerten, wurden die neutrophilen Granulozyten im Lungengewebe gezählt.

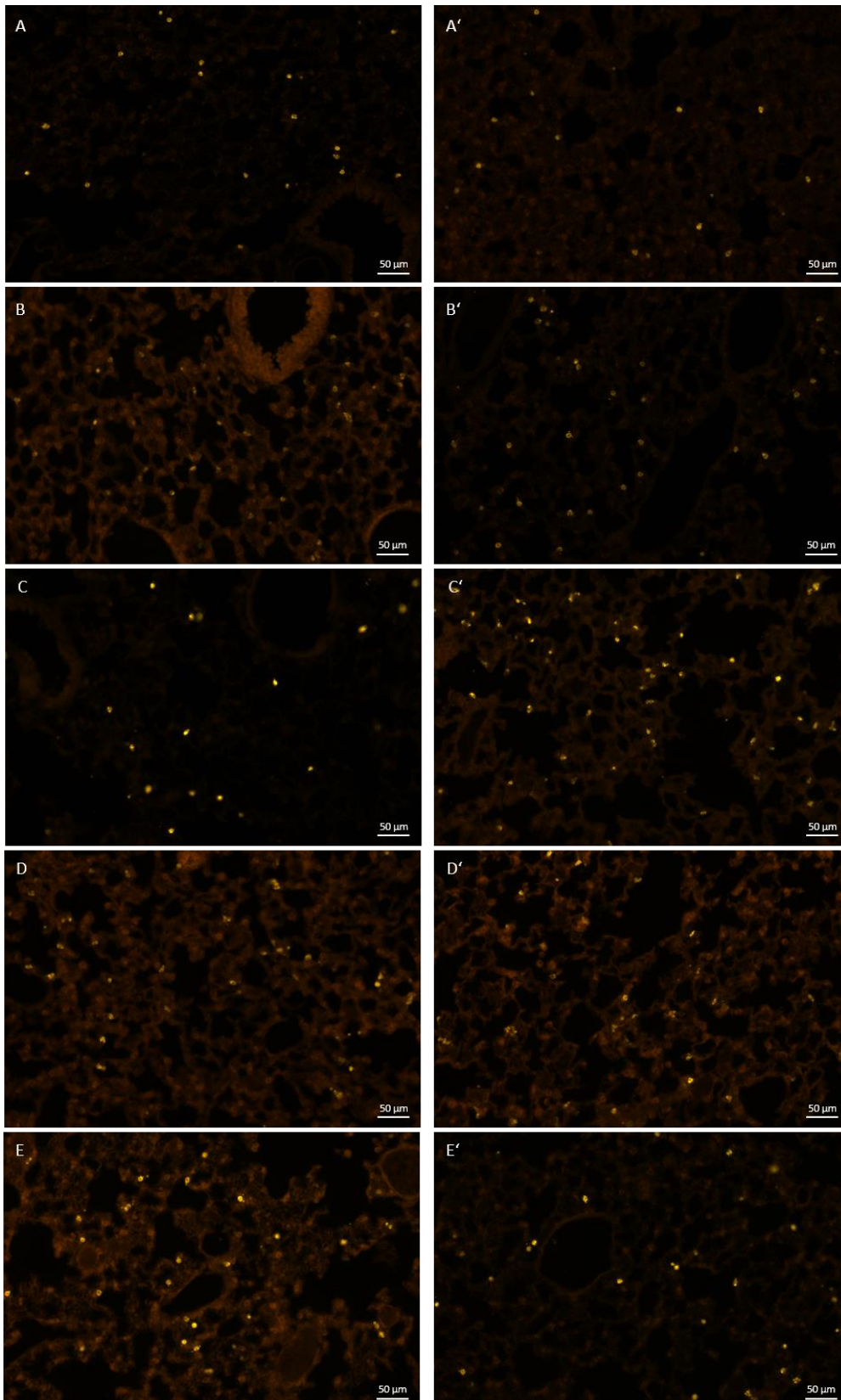


Abbildung 3.23: neutrophile Granulozyten in der Lunge (Ly6G-positiv, gelb, Cy3); A-E: TRPM5^{+/+}-Tiere. A'-E': TRPM5^{-/-}-Tiere. A-A': Kontrollgruppe. B-B': Vehikelgruppe. C-C': 1-Tages-Gruppe. D-D': 3-Tages-Gruppe. E-E': 7-Tages-Gruppe. Gut zu sehen ist der Unterschied in der Denatonium-1-Tages-Gruppe: hier finden sich mehr Neutrophile beim TRPM5^{-/-}-Tier (C'). In der 7-Tages-Gruppe hingegen sind beim Wildtyp (E) mehr positive Zellen zu sehen.

3.7.2 Vergleich der TRPM5^{+/+}- und TRPM5^{-/-}-Tiere

Die Werte der Zählung wurden mittels des Kolmogorov-Smirnov Tests auf Normalverteilung geprüft. Das Ergebnis war variabel, normalverteilt waren folgende Gruppen: TRPM5^{-/-}-Kontrollgruppe, sowie die Vehikel-, 3-Tages- und 7-Tages-Denatonium der Wildtypen. Neben der Auswertung der deskriptiven Statistik wurde nun der Kruskal-Wallis-Test (signifikant mit $p < 0,0001$ und Kruskal-Wallis statistic von 303,0) mit Dunnett's Mehrfachvergleich durchgeführt, um signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen aufzudecken.

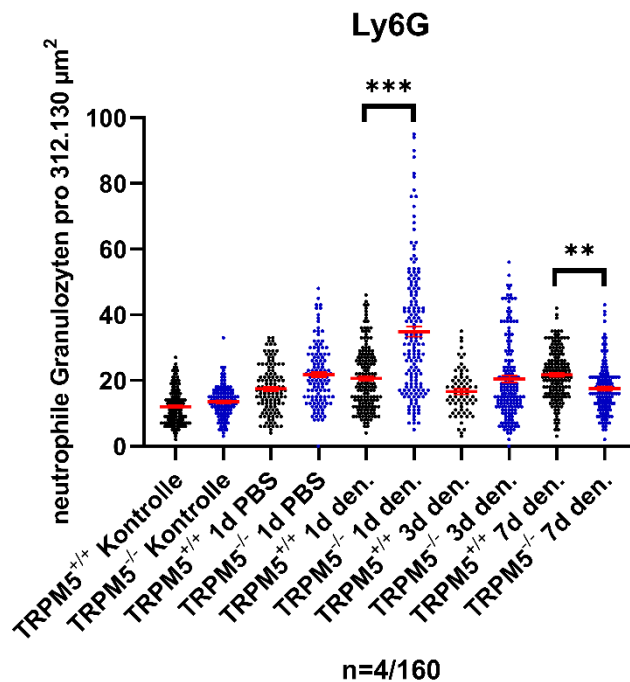


Abbildung 3.24: Vergleich der Anzahl an neutrophilen Granulozyten in allen Versuchsgruppen. Besonderes Augenmerk wird hier auf den Vergleich zwischen den Mausstämmen gelegt. Dunnett's multiple Vergleichstests mit $p < 0,05$ als signifikant.

Hier fiel auf, dass sowohl bei der reinen Organentnahme nach Perfusion als auch nach Vehikelinhalation es zu keinem Unterschied zwischen den TRPM5^{+/+}- und den TRPM5^{-/-}-Tieren kam (Abb. 3.24). Währenddessen zeigte sich ein Tag nach Denatoniuminjektion eine im Mittel um 69% gesteigerte Anzahl an Neutrophilen bei den TRPM5^{-/-}-Tieren im Vergleich zu den Wildtypen ($p < 0,001$). 3 Tage nach Injektion glichen sich die Zahlen in beiden Gruppen annähernd an, bis es nach 7 Tagen wieder zu Unterschieden kam ($p = 0,001$). Hier fanden sich bei den Wildtypen eine um 24% höhere Anzahl an Neutrophilen als bei den TRPM5^{-/-}-Tieren.

3.7.3 Auswirkung der Vehikelinhalation auf die Anzahl an neutrophilen Granulozyten in der Lunge

Bei beiden Mausstämmen zeigte sich ein eindeutiger Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der Vehikelgruppe (Abb. 3.25). Bei den Wildtypen (Abb. 3.25, A) fand sich 1 Tag nach

Vehikelinhalation eine um 45% höhere Anzahl an Neutrophilen ($p < 0,001$) und bei den TRPM5^{-/-}-Tieren (Abb. 3.25, B) betrug diese Erhöhung in der Vehikelgruppe 61% ($p < 0,001$).

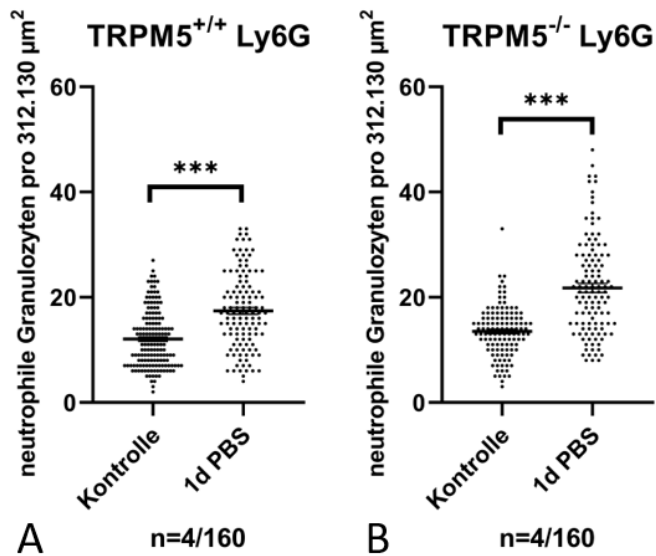


Abbildung 3.25: Auswirkung der Vehikelinhalation auf die Zahl der neutrophilen Granulozyten in der Lunge. Bei beiden Mausstämmen steigt die Zahl deutlich durch die Inhalation des Vehikels PBS.

3.7.4 Zeitlicher Verlauf bei TRPM5^{+/+}-Tieren und TRPM5^{-/-}-Tieren

Weiterhin wurden die Gruppen innerhalb eines Mausstamms miteinander verglichen. Die Streuung der Werte zwischen den Wildtypen und den TRPM5^{-/-}-Tieren unterschied sich (Abb. 3.26).

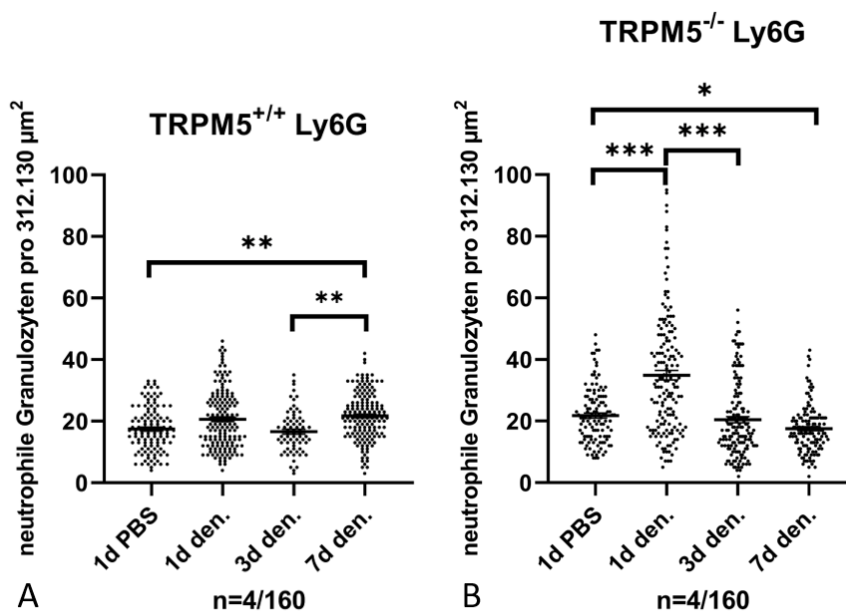


Abbildung 3.26: Entwicklung der Neutrophilen-Zahlen in der Lunge im Zeitverlauf entsprechend dem Mausstamm.

Besonders ein und drei Tage nach Denatoniuminjektion fand sich bei den TRPM5^{-/-}-Tieren eine relativ große Streuung, welche sich auch in deutlich erhöhten Standardabweichungen und

Standardfehlern des Mittelwerts wiederfand (siehe Anhang, Tab. 10.4). In diesem Zusammenhang fand sich auch eine stärkere Variabilität der Zählungen im zeitlichen Verlauf bei den TRPM5^{-/-}-Tieren. So fanden sich bei den Wildtypen keine signifikanten Unterschiede zwischen der Vehikelgruppe und der 1-Tages Denatoniumgruppe oder auch zwischen den 1-Tages und 3-Tages Denatoniumgruppen. Bei den TRPM5^{-/-}-Tieren hingegen finden sich hier signifikante Unterschiede (Abb. 3.26): sowohl zwischen der Vehikel- und der 1-Tages-Denatoniumgruppe ($p < 0,001$) als auch zwischen der 1-Tages und der 3-Tages Denatoniumgruppe ($p < 0,001$).

Der Unterschied zwischen der Vehikel-Gruppe und der 7-Tages Denatoniumgruppe war sowohl bei den Wildtypen ($p = 0,0026$) als auch bei den TRPM5^{-/-}-Tieren ($p = 0,0349$) signifikant. Dennoch fand sich 7 Tage nach Denatoniuminjektion eine entgegengesetzte Entwicklung der Neutrophilen-Zahlen. So blieben die Zahlen bei den TRPM5^{-/-}-Tieren konstant mit leicht abfallender Tendenz, während bei den Wildtypen eine signifikante ($p = 0,002$, zur 3-Tages Gruppe) Zunahme um 31% zu beobachten war.

Bei beiden Mausstämmen fand sich über den gesamten Zeitverlauf eine Steigerung der Neutrophilen-Zahlen in der Lunge. So stiegen die Zahlen bei den Wildtypen im Mittel um 80% ($p < 0,001$) und bei den TRPM5^{-/-}-Tieren um 30% ($p = 0,005$) zwischen der Kontroll-Gruppe, welche keinerlei Intervention erhielt, und der 7-Tages Denatoniumgruppe (vgl. Abb. 3.25 zu 3.26).

3.7.5 Granula um neutrophile Granulozyten herum

Bei der Färbung von neutrophilen Granulozyten, fielen ein Tag nach Denatoniuminjektion bei TRPM5^{+/+}-Tieren Granula-ähnliche Strukturen in der Peripherie der neutrophilen Granulozyten auf (Abb. 3.27). Solche Strukturen konnten in anderen Gruppen nicht gesehen werden. Die Neutrophilen wurden mit einem FITC-konjugierten Antikörper gegen Ly6G gefärbt. Man erkennt kleine rundliche Partikel um die Neutrophilen herum (Abb. 3.27).

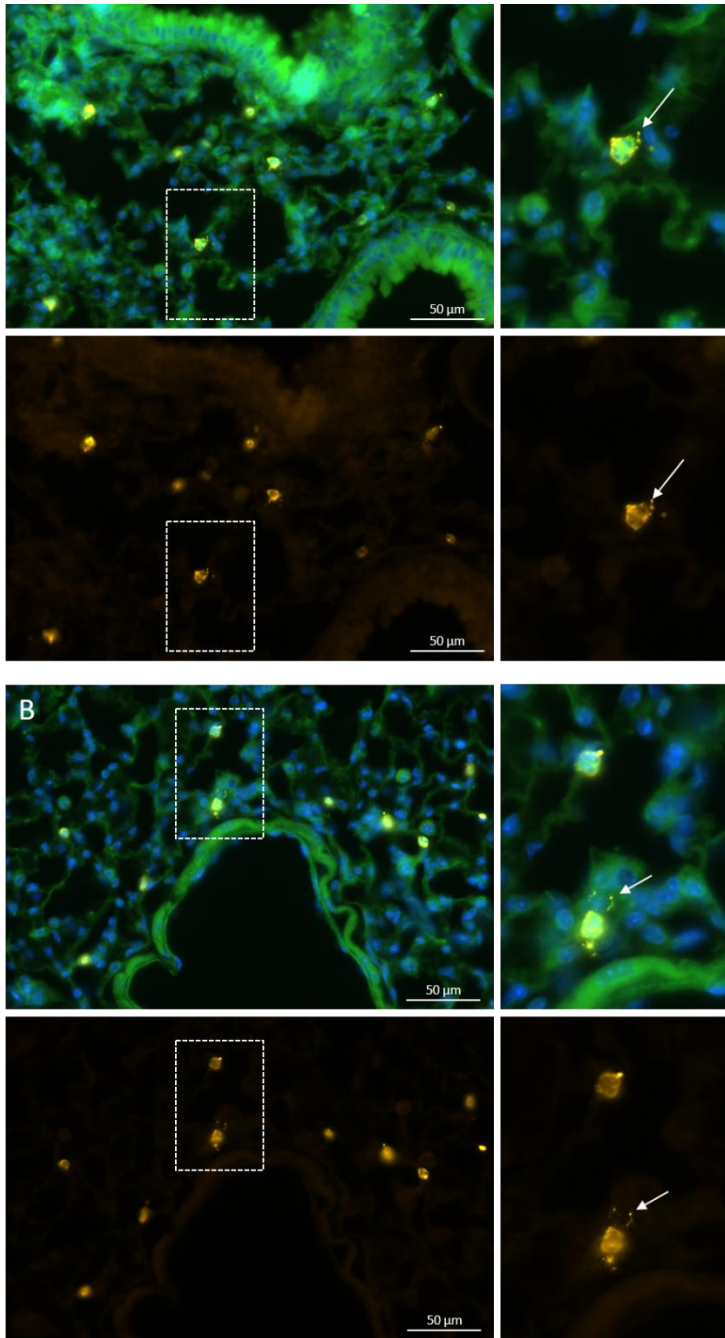


Abbildung 3.27: Lunge, TRPM5^{+/+}-Maus, IHC gegen Ly6G (FITC grün und Cy3 gelb) und DAPI (blau). Abgebildet sind die beobachteten Granula, 1 Tag nach Denatoniuminhalation.

3.7.6 Neutrophile Granulozyten im Bereich der Hauptbronchien

Im Bereich der Hauptbronchien wurde eine geringere Anzahl an Neutrophilen im Bereich zwischen Epithel und Lamina propria festgestellt (Abb. 3.28), als zu erwarten war.

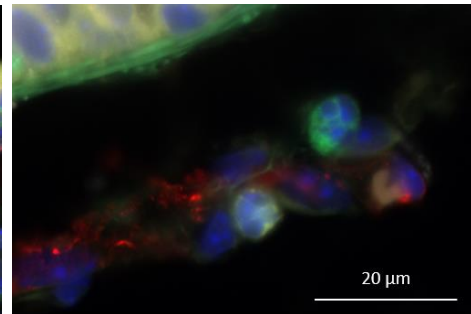
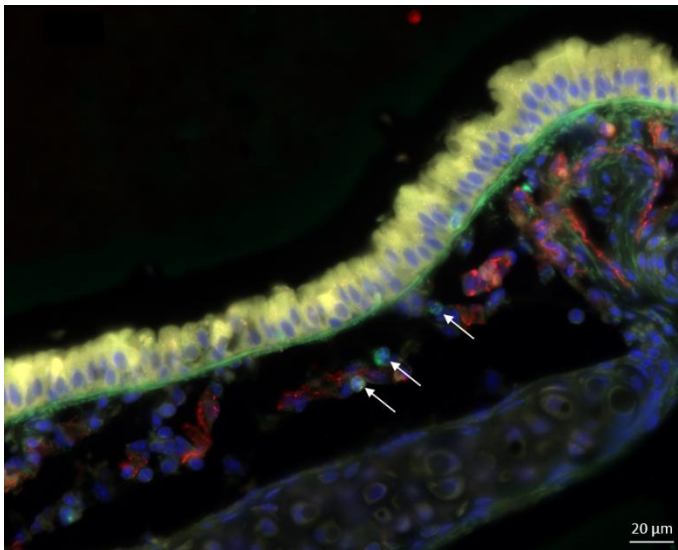


Abbildung 3.28: IHC der Lunge eines Wildtyps ein Tag nach Denatonium-inhalation. Zu sehen sind in grün (Ly6G-FITC) Neutrophile, in rot Gefäße (CD31) und in weiß Nerven (PGP 9.5). Hier sind nur sehr wenige Neutrophile zu sehen (Pfeile).

3.8 B-Lymphozyten in der Lunge

3.8.1 Immunhistochemische Darstellung der B-Lymphozyten in der Lunge

Als weiterer Parameter für die Entzündungsaktivität in der Lunge wurden die CD45R-positiven Zellen identifiziert (Abb. 3.29) und dann auch quantifiziert.

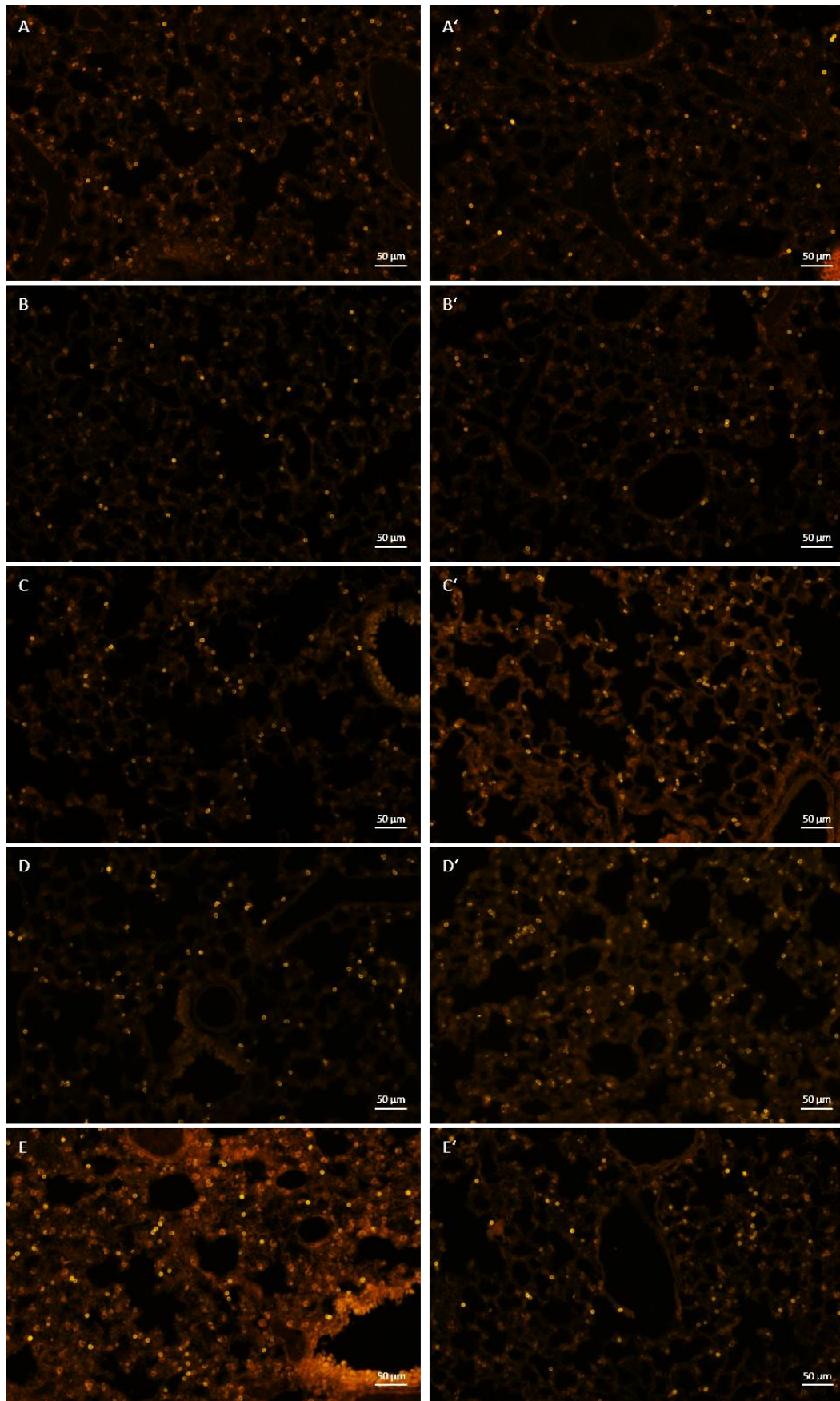


Abbildung 3.29: B-Lymphozyten der Lunge (CD45R-positiv, gelb, Cy3); A-E: TRPM5^{+/+}-Tiere. A'-E': TRPM5^{-/-}-Tiere. A-A': Kontrollgruppe. B-B': Vehikelgruppe. C-C': 1-Tages-Gruppe. D-D': 3-Tages-Gruppe. E-E': 7-Tages-Gruppe.

3.8.2 Vergleich der TRPM5^{+/+}- und TRPM5^{-/-}-Tiere

Die Durchführung des Kolmogorov-Smirnov-Tests ergab, dass ausschließlich die Vehikel-Gruppe des TRPM5^{-/-}-Mausstamms normalverteilt war. Für die weitere Analyse wurde entsprechend der Kruskal-Wallis Test verwendet mit Dunnett's multiplen Vergleichstests.

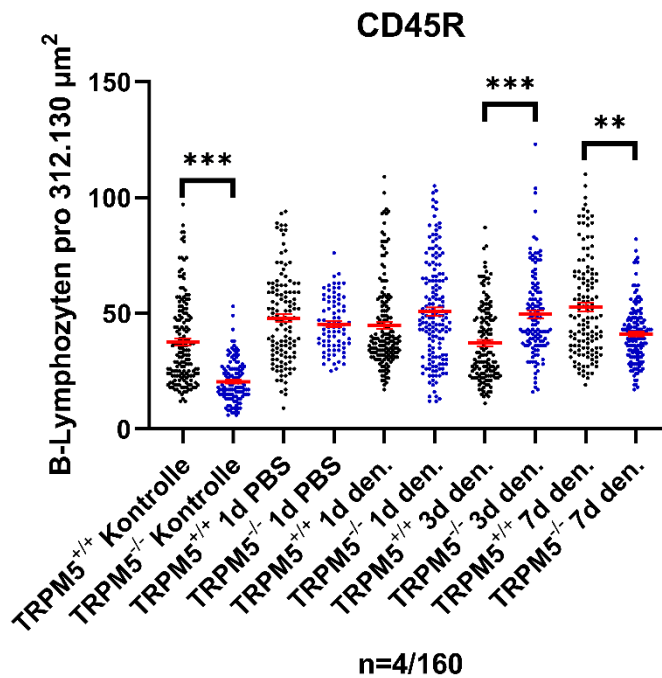


Abbildung 3.30: Vergleich der Anzahl an B-Lymphozyten in allen Versuchsgruppen. Besonderes Augenmerk wird hier auf den Vergleich zwischen den Mausstämmen gelegt. Dunnett's multiple Vergleichstests mit $p < 0,05$ als signifikant.

Eine starke Diskrepanz zwischen den B-Lymphozyten-Zahlen der reinen Kontrollgruppen ($p < 0,001$) wurde beobachtet (Abb. 3.30). So fanden sich bei den Wildtypen 84% mehr B-Lymphozyten als bei den TRPM5^{-/-}-Tieren. Auch am 3. ($p < 0,001$) und 7. Tag ($p = 0,0061$) nach der Inhalation zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Mausstämmen.

3.8.3 Auswirkung der Vehikelinhalation auf die B-Lymphozytenzahlen in der Lunge

Wie auch bei den zuvor beschriebenen Analysen untersuchten wir hier die Auswirkung der OP und Vehikelinhalation selbst. Hierbei zeigt sich bei beiden Mausstämmen eine deutliche Zunahme der B-Zellen durch die Vehikelinhalation (Abb. 3.31).

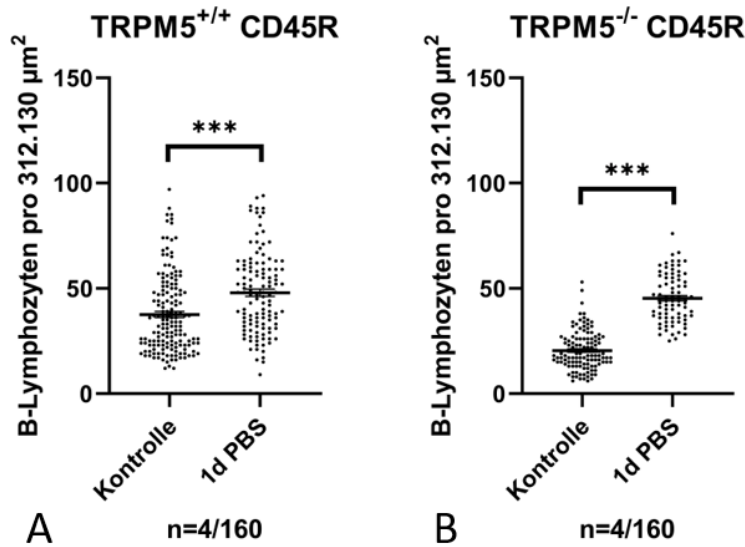


Abbildung 3.31: Auswirkung der operativen Maßnahme mit Vehikelinhalation auf die Zahl der B-Lymphozyten in der Lunge. Bei beiden Mausstämmen steigt die Zahl deutlich durch die Injektion des Vehikels PBS.

3.8.4 Zeitlicher Verlauf bei TRPM5^{+/+}-Tieren und TRPM5^{-/-}-Tieren

Ab dem 3. Tag nach Denatoniuminhalation fanden sich hier bei den Wildtypen ähnliche Veränderungen wie bei den Neutrophilen-Zahlen (vgl. Abb. 3.26 und 3.32). So fanden sich drei Tage nach Denatoniuminhalation bei den TRPM5^{-/-}-Tieren um 34% höhere Lymphozyten-Zahlen als bei den Wildtypen. Nach sieben Tagen kehrte sich dieses Verhältnis um und es fanden sich nun bei den Wildtypen um 28% höhere Lymphozyten-Zahlen als bei den TRPM5^{-/-}-Tieren (vgl. Abb. 3.30). Diese Tendenz zur Umkehr des Mengenverhältnisses fand sich auch bei den Neutrophilen in schwächerer Ausprägung.

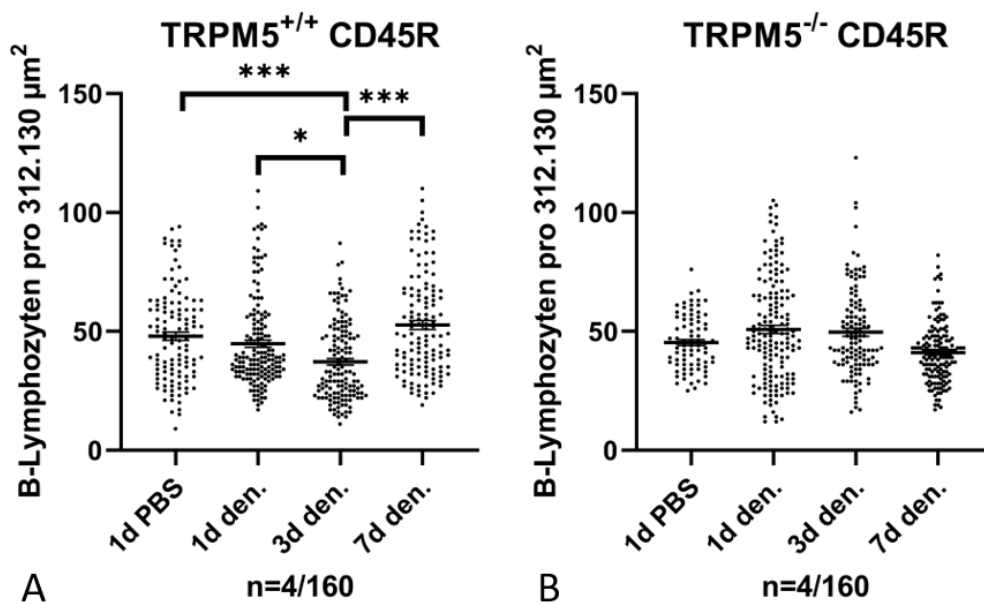


Abbildung 3.32: zeitlicher Verlauf der Anzahl an B-Lymphozyten nach Mausstämmen separiert.

Im direkten Vergleich (Abb. 3.32) zeigte sich, dass auch hier (wie bei den Neutrophilen) bei den Wildtypen kein signifikanter Unterschied zwischen der Vehikelgruppe und der 1-Tages Denatonium Gruppe bestand. Interessanterweise fand sich bei den TRPM5^{+/+}-Tieren (und nicht bei den TRPM5^{-/-}-Tieren) eine Steigerung der Lymphozyten um 42% zwischen dem 3. und 7. Tag nach Denatoniuminjektion ($p < 0,001$). Sowohl im Vergleich zur Vehikelgruppe ($p < 0,001$) als auch zur 1-Tagesdenatoniumgruppe ($p = 0,0385$) fielen die B-Lymphozytenzahlen am 3. Tag nach Denatoniuminhalation bei den Wildtypen. Währenddessen blieben die Zellzahlen bei den TRPM5^{-/-}-Tieren weitestgehend konstant, auch im Vergleich zur Vehikelgruppe (alle p-Werte $> 0,999$).

3.9 T-Lymphozyten in der Lunge

3.9.1 Immunhistochemische Darstellung der T-Lymphozyten in der Lunge

Um die adaptive Immunantwort im Rahmen unseres Versuchsaufbaus besser zu untersuchen und zu verstehen, wurden die T-Lymphozyten in der Lunge markiert und quantifiziert (Abb. 3.33).

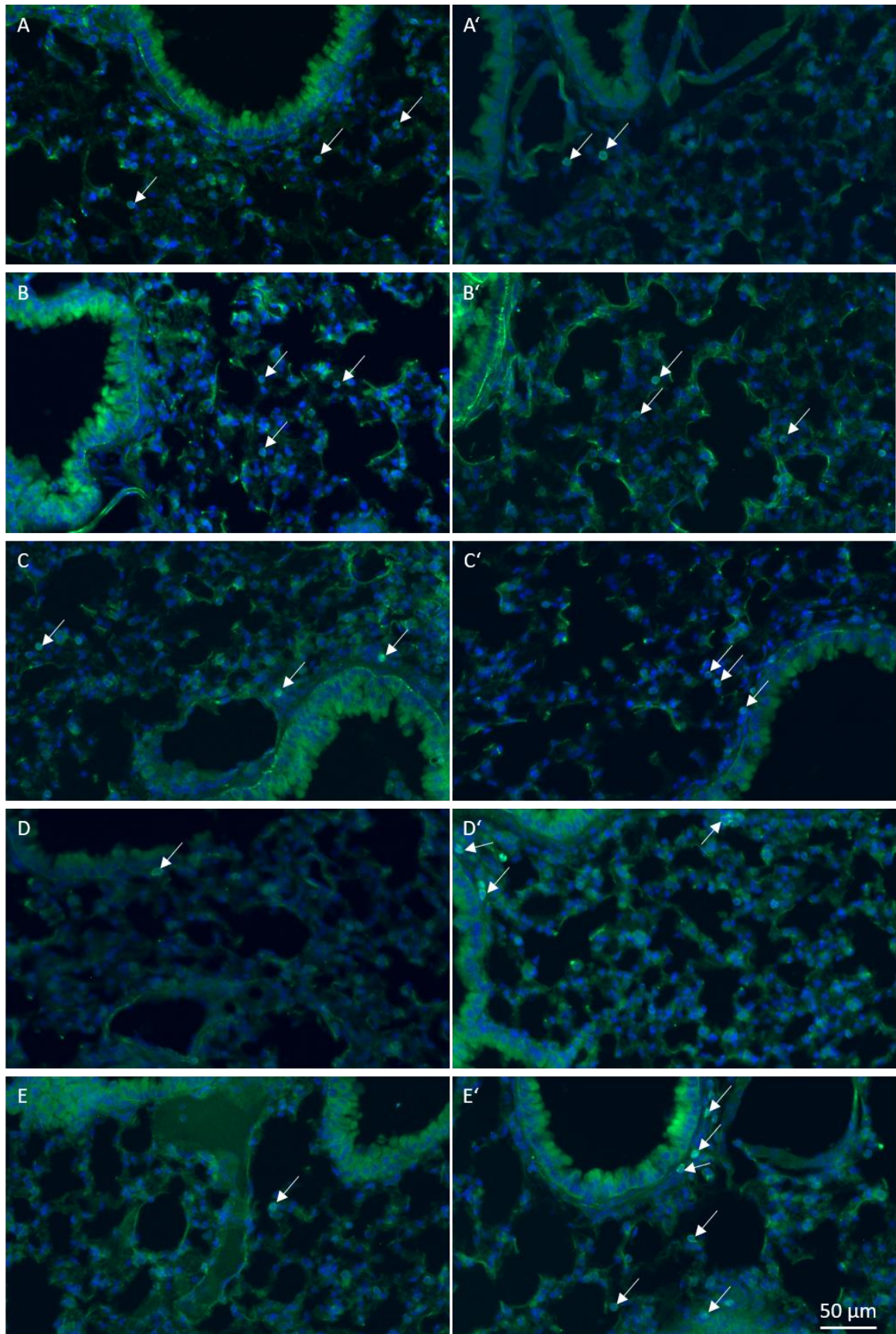


Abbildung 3.33: immunohistochemische Darstellung der T-Lymphozyten (CD3, grün) in der Lunge von TRPM5^{+/+}- (A-E) und TRPM5^{-/-}-Mäusen (A'-E'). A-A': Kontrollgruppe. B-B': Vehikelgruppe. C-C': 1-Tages-Gruppe. D-D': 3-Tages-Gruppe. E-E': 7-Tages-Gruppe. Hieraus wird die Zunahme der T-Lymphozyten bei den TRPM5^{-/-}-Tieren nach 7 Tagen ersichtlich.

3.9.2 Auswirkung der Vehikelinhalation auf die T-Lymphozytenzahlen in der Lunge

Normalverteilt nach Kolmogorov-Smirnov waren alle Kontroll- und Vehikelgruppen sowie die restlichen TRPM5^{-/-}-Gruppen. Zur weiteren Analyse wurde dementsprechend der Kruskal-Wallis-Test mit Dunnets multiplen Vergleichstest verwendet und eine deskriptive Statistik durchgeführt (siehe Anhang, Tab. 10.6).

Sowohl bei den TRPM5^{-/-} (p=0,2885) als auch bei den TRPM5^{+/+}-Tieren (p>0,999) gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der Vehikelgruppe (Abb. 3.34).

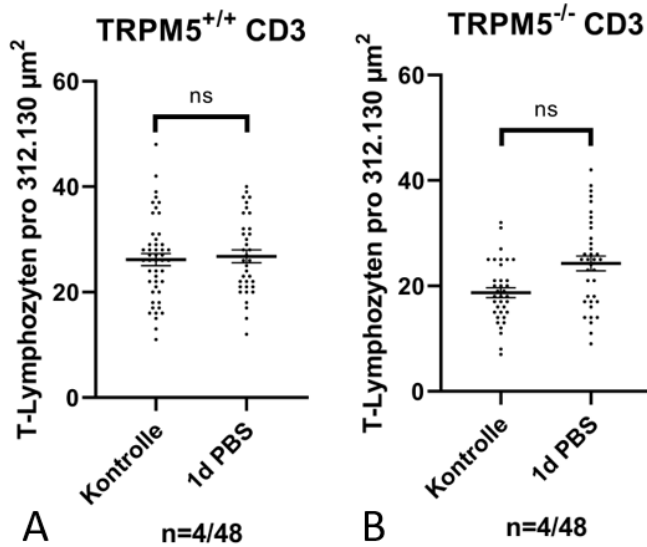


Abbildung 3.34: die reine operative Maßnahme mit Vehikelinhalation hat keine Auswirkung auf die T-Lymphozytenzahl in der Lunge.

3.9.3 Vergleich der TRPM5^{+/+}- und TRPM5^{-/-}-Tiere

In den Kontrollgruppen, den Vehikelgruppen und der 1-Tages-Denatonium-Gruppe zeigten sich keine wesentlichen oder signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Mausstämmen. Sowohl in den 3-Tages- und 7-Tages-Gruppen fanden sich aber signifikant höhere T-Zellzahlen bei den TRPM5^{-/-}-Tieren im Vergleich zu den TRPM5^{+/+}-Tieren (Abb. 3.35). Beide Unterschiede stellten sich mit p-Werten von jeweils $\leq 0,001$ als hochsignifikant heraus.

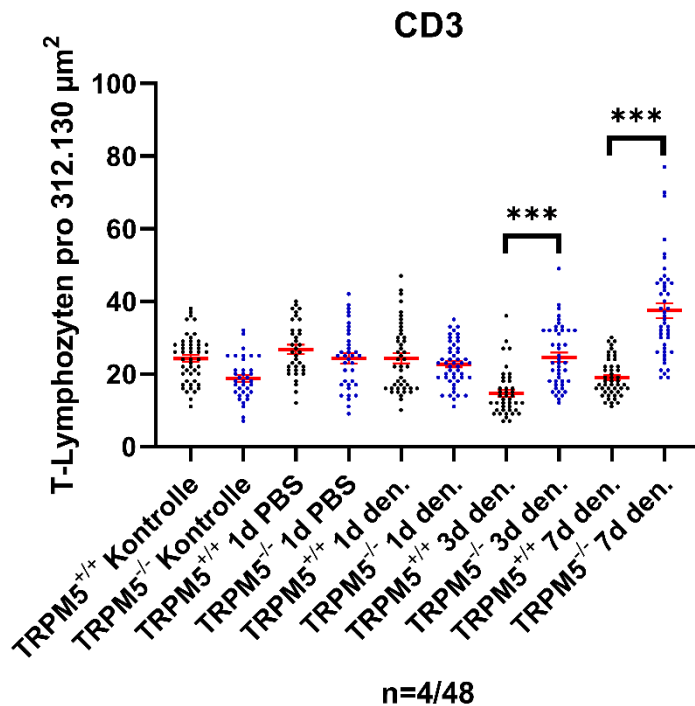


Abbildung 3.35: Vergleich der Anzahl an T-Lymphozyten in allen Versuchsgruppen. Besonderes Augenmerk wird hier auf den Vergleich zwischen den Mausstämmen gelegt. Dunnett's multiple Vergleichstests mit $p < 0,05$ als signifikant.

3.9.4 Zeitlicher Verlauf bei TRPM5^{+/+}-Tieren und TRPM5^{-/-}-Tieren

Um die immunologischen Vorgänge besser zu verstehen, ist auch hier die Untersuchung des zeitlichen Verlaufs beider Mausstämmen wichtig (Abb. 3.36). Hierbei zeigte sich bei den TRPM5^{+/+}-Tieren ein signifikanter ($p \leq 0,001$) Abfall der T-Zellzahlen von der Vehikelinhalation ($p < 0,001$) und vom 1. ($p < 0,001$) zum 3. Tag nach Denatoniuminhalation. Auch zwischen der Vehikelgruppe und der 7-Tages-Denatoniumgruppe konnte ein signifikanter Unterschied gezeigt werden ($p < 0,001$). Bei den TRPM5^{-/-}-Tieren hingegen waren die Zahlen bis zum 3. Postoperativem Tag stabil und stiegen dann an Tag 7 signifikant ($p \leq 0,001$) an. Dazu passend zeigte sich auch ein signifikanter Unterschied zwischen der Vehikelgruppe und der 7-Tages-Denatoniumgruppe ($p < 0,001$).

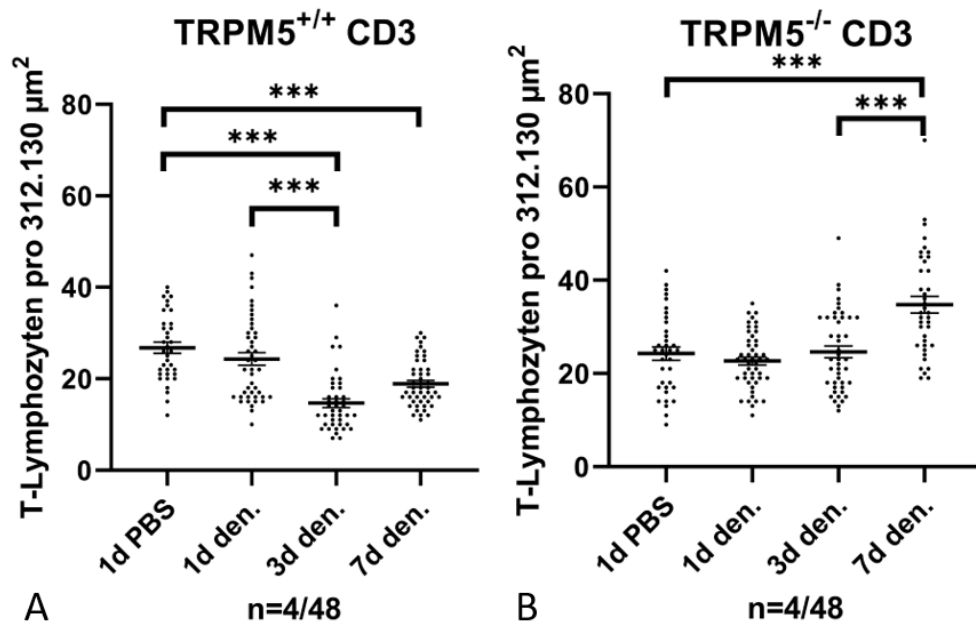


Abbildung 3.36: zeitlicher Verlauf der T-Lymphozytenzahlen nach Mausstamm getrennt.

3.10 Makrophagen in der Lunge

Im Rahmen immunhistochemischer Versuchsfärbungen zeigte sich eine Immunreaktivität von Makrophagen gegenüber einem Lectin-Antikörper, welche schon zuvor bei aktivierten Makrophagen gezeigt wurde (Reece et al. 2006). Daher wurde die Färbung mit diesem Antikörper auf je einem Lungenschnitt jeder Versuchsgruppe durchgeführt und deskriptiv analysiert. Hierbei zeigten sich beim Vergleich der Gruppen im Wesentlichen zwei markante Punkte. Zum einen schien es bei den Wildtypen einen Tag nach der Denatoniuminhalation (Abb 3.37, B) eine deutliche Zunahme der Anzahl an aktivierten Makrophagen zu geben, im Vergleich zur Kontrollgruppe, bei der nur PBS als Vehikel (Abb. 3.37, A) injiziert wurde. Diese Zunahme konnte bei den TRPM5^{-/-}-Tieren jedoch nicht beobachtet werden. Zum anderen wurde nach dieser Anreicherung an Makrophagen im Gewebe nach 7 Tagen bei den Wildtypen (Abb. 3.37, D) eine Rückkehr zum Ausgangsstand beobachtet; so glichen sich die Darstellungen der Lunge 7 Tage nach Denatoniuminjektion und 1 Tag nach Vehikelinhalation weitgehend. Bei den TRPM5^{-/-}-Mäusen (Abb. 3.37, A'-D') hingegen konnten keine nennenswerten Fluktuationen in der Anzahl der aktivierten Makrophagen beobachtet werden.

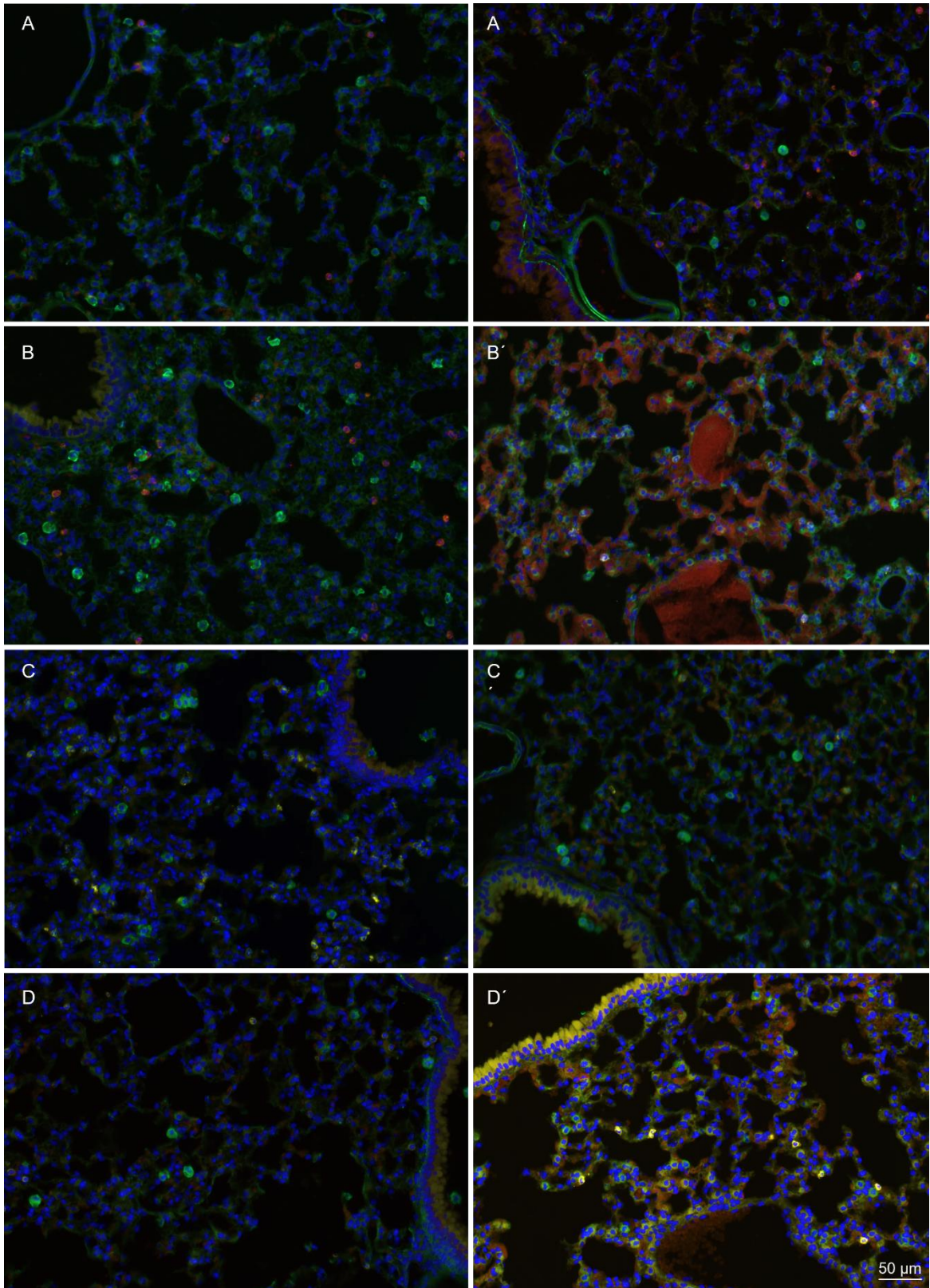


Abbildung 3.37: immunhistochemische Darstellung der Makrophagen (Lectin, grün) in der Lunge von TRPM5^{+/+}- (A-D) und TRPM5^{-/-}-Mäusen (A'-D'). A-A': Vehikelgruppe. B-B': 1-Tages-Gruppe. C-C': 3-Tages-Gruppe. D-D': 7-Tages-Gruppe.

Bei der Testung eines neuen F4/80-Antikörpers fielen uns Ansammlungen von stark positiven Zellen im subpleuralen Bereich der Lunge auf (Abb. 3.38, A, A', C und C'). Diese Ansammlungen fanden

sich bei den Wildtypen der 1-Tages-Denatoniumgruppe, während bei dem Vergleichs-TRPM5^{-/-}-Tier keine solchen Ansammlungen zu sehen waren (Abb. 3.38, B und D). Auch peribronchial konnten nur bei den Wildtypen vermehrt Zellen mit einer starken Fluoreszenz auf F4/80 gefunden werden (Abb. 3.38, C').

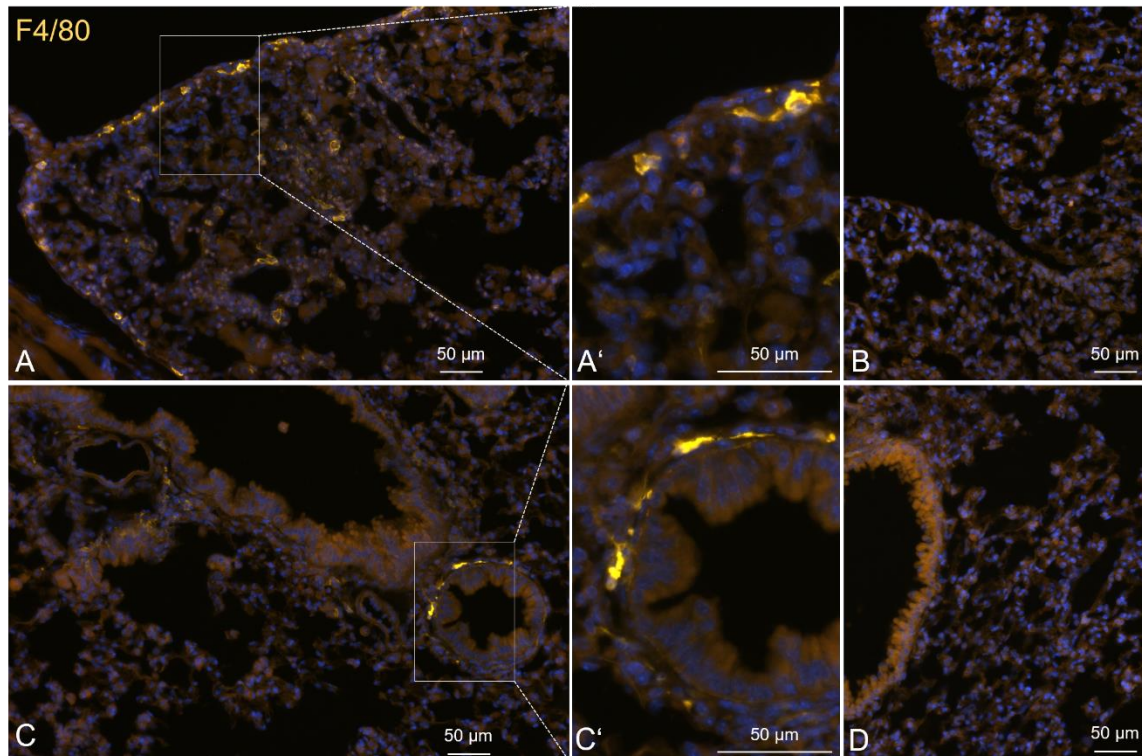


Abb. 3.38: A, A', C und C': TRPM5^{+/+} 1d Den.; B und D: TRPM5^{-/-} 1d Den. Bei den Wildtypen sind zahlreiche stark F4/80-positive (gelb) Zellen zu sehen. Diese Zellen sammeln sich subpleural (A') und peribronchial (C') an. Bei den TRPM5^{-/-}-Tieren sind solche Ansammlungen nicht zu sehen.

Um herauszufinden, ob diese stark positiven Zellen sich innerhalb oder in der Nähe von Lymphgefäßen befinden, führten wir eine Nachfärbung der Schnitte mit dem Lyve-1-Antikörper durch. Hierbei zeigten sich die F4/80-positiven Zellen bei den Wildtypen oft in der Nähe der Lymphgefäße (Abb. 3.39).

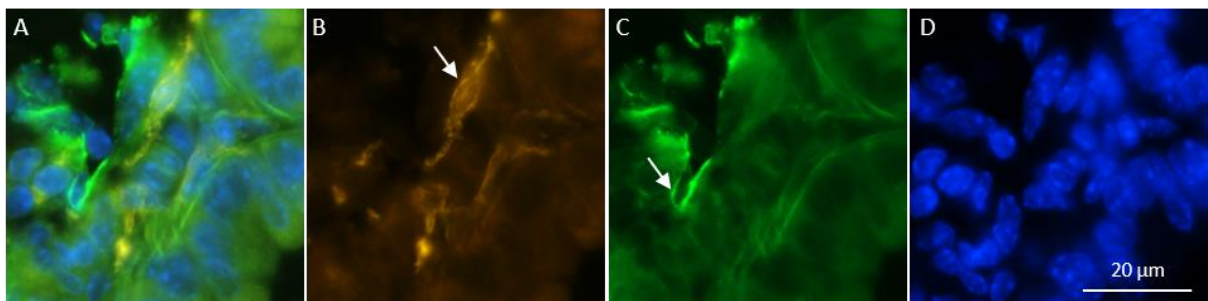


Abb. 3.39: Immunhistochemie eines Tieres der 1-Tages-Denatoniumgruppe mit Antikörpern gegen F4/80 (gelb) und Lymphgefäße (Lyve-1, grün). Kernfärbung mit DAPI (D). Hier soll die Proximität der F4/80-positiven Zelle (Pfeil in B) zum Lymphgefäß (Pfeil in C) dargestellt werden.

4. Diskussion

4.1 Die immunregulatorische Rolle der Bürstenzelle und des TRPM5-Kanals

4.1.1 Die Bedeutung der Pneumonie

In einer statistischen Aufstellung der häufigsten Todesursachen in den Vereinigten Staaten von Amerika aus dem Jahre 2015 wurde gezeigt, dass die Pneumonie zu den 10 meist vertretenen Todesursachen gehört (Neron 2017). Im Pschyrembel sowie auch von der World Health Organisation (WHO, 24.05.2018) wird die Pneumonie als vierthäufigste Todesursache weltweit beschrieben. Somit ist die Pneumonie heutzutage ein weltweites Problem und kostet täglich Menschenleben. Zusätzlich zu dem massiven klinischen Gesichtspunkt ist die Pneumonie auch wirtschaftlich von Relevanz. So belaufen sich die gesamten durch „community-acquired“-Pneumonien verursachten Kosten in Europa auf 10 Milliarden Euro jährlich (Welte et al. 2012). Die Pneumonie stellt also heutzutage trotz moderner Medizin auch in entwickelten Ländern ein Problem dar, welches es nach wie vor anzugehen gilt. Besonders zeigt sich dies in der Pandemie durch das SARS-CoV-2, welches sich seit Beginn des Jahres 2020 massiv verbreitet, weltweit zahlreiche Todesopfer fordert und eine enorme Einschränkung des öffentlichen Lebens und der Freiheit des Einzelnen bedeutet. Die vorliegende Arbeit gründet auf dieser Relevanz der Lungenentzündung, insbesondere von *Pseudomonas aeruginosa*-induzierten Pneumonien. Es ist unerlässlich, weitere therapeutische und prophylaktische Methoden zu entwickeln, um mit dieser Problematik auch in Zukunft umgehen zu können.

4.1.2 Die immunologische Funktion der Bürstenzelle

In diesem Kontext beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit dem speziellen Zelltyp der trachealen Bürstenzelle, da aus bisherigen Forschungsergebnissen die Möglichkeit einer klinischen Relevanz (in Bezug auf entzündliche Erkrankungen der Atemwege) dieser Zellen hervorgeht. Die Funktion der Bürstenzelle stellt jedoch nach wie vor das größte ihrer Rätsel dar. So konnten nach und nach spannende Hinweise auf Teilaspekte ihrer Funktion gefunden werden (Bankova et al. 2018; Hollenhorst et al. 2020). Zudem detektieren tracheale Bürstenzellen bakterielle Peptide, welche in der Folge (vermutlich über eine Aktivierung des TRPM5-Kanals) zur Acetylcholin (ACh)-Ausschüttung führen (Krasteva et al. 2012a). ACh bindet am mAChR an ziliert tragende Zellen, wo es die mukoziliäre Clearance fördert (Perniss et al. 2020). Auch der Nachweis der Fähigkeit von nasalen Bürstenzellen zur Detektion von ATP (Stresssignal) mittels des P2Y2-Rezeptors, mit der Folge einer Freisetzung von cysteinyl-Leukotrienen (Ualiyeva et al. 2020), untermauert die immunologische Funktion der Bürstenzellen. Hierbei muss jedoch beachtet werden, dass nicht sämtliche Ergebnisse von nasalen Bürstenzellen auf tracheale Bürstenzellen übertragen werden können, da es zwischen beiden Zelltypen Unterschiede gibt, sowohl in ihrer Funktion als auch in der umgebenden Anatomie und Physiologie. Beispielsweise scheint eine Signalweiterleitung in von den

SCCs der Nase über Gap Junctions denkbar (Lee et al. 2014), während diese bei trachealen Bürstenzellen eher ausgeschlossen wird (Hollenhorst et al. 2020; Lasconi et al. 2019). Natürlich gibt es aber auch zahlreiche Gemeinsamkeiten der beiden Typen: so senkt Denatonium z.B. nach Stimulation der Bürstenzellen an beiden Lokalisationen die Atemfrequenz (Hollenhorst et al. 2020; Tizzano et al. 2010). Die vorliegende Arbeit hat als Ziel, nun weitere Aspekte über Funktionen der trachealen Bürstenzellen zu liefern.

4.1.3 Eine hohe interindividuelle Variabilität bei den TRPM5^{-/-}-Tieren

Besonders in Hinblick auf immunologische Funktionen der Bürstenzellen wurden unter anderem die Streuungsmaße der neutrophilen Granulozyten in der Lunge analysiert. Hierbei stellten wir eine deutlich größere Streuung bei den TRPM5^{-/-}-Tieren fest, sowohl in Hinblick auf die nicht robusten als auch auf die robusten Streuungsmaße (siehe Anhang, Tab. 10.4). Diese stärkere Streuung lässt die Vermutung zu, dass regulatorische Mechanismen, welche eine interindividuelle Stabilität fördern würden, fehlen. Besonders stark zeigt sich das bei der 1-Tages Denatonium-Gruppe der TRPM5^{-/-}-Tiere. Hier kommt es teilweise zu einer überschießenden Immunreaktion mit sehr hohen Zahlen an Neutrophilen in den Lungen. Hierbei ist zu beachten, dass Neutrophile neben ihrer protektiven Funktion gegenüber Eindringlingen auch schädliche Wirkungen auf das Gewebe haben (Grommes et Soehnlein 2011). Ob dieses starke inflammatorische Geschehen also positiv ist, ist zumindest fragwürdig. Bei den TRPM5^{-/-}-Tieren kommt es, nach dem starken Anstieg am 1. postoperativen Tag, ab dem 3. Tag zu einem Abfall der Immunaktivität (in Bezug auf die Neutrophilenzahl) in der Lunge (Abb. 3.26). Dieser Abfall könnte als „Erschöpfung“ des Immunsystems gedeutet werden. Insgesamt lässt sich bei den TRPM5^{-/-}-Tieren kein sinnvoll nachvollziehbares Muster im Sinne einer koordinierten Immunreaktion erkennen. Im Szenario einer typischen Lobärpneumonie kommt es nach ca. 4-6 Tagen zum Stadium der grauen Hepatisation, in welchem die größte Menge an Neutrophilen einwandert (Kirchner T et al. 2018). Dies könnte somit eher einem Anstieg der Neutrophilen nach sieben Tagen entsprechen, wie es bei den Wildtypen zu beobachten ist. Auch die Dynamik der T-Lymphozyten in der Lunge erweist sich bei den TRPM5^{-/-}-Tieren als „unlogisch“. So steigen bei den TRPM5^{-/-}-Tieren die T-Zellen ab dem 3. Tag postoperativ an, während sie bei den TRPM5^{+/+}-Tieren zwischen dem 1. und 3. postoperativem Tag erwartungsgemäß wieder fallen. Solch ein Abfall ist anhand der Immunphysiologie zu erklären, denn die T-Zellaktivierung und folgende Proliferation und Differenzierung findet erst nach Antigenkontakt statt (Murphy K et Weaver C 2018). Die Persistenz dieses stimulierenden Antigens fehlt im vorliegenden Versuchsaufbau jedoch. Der Anstieg der T-Zellen bei den TRPM5^{-/-}-Tieren ist also im immunologischen Sinne kontraintuitiv, da kein dauerhaft vorhandenes Antigen zur Stimulation der Expansion und Differenzierung vorhanden ist. Zudem sollte beachtet werden, dass für die korrekte Aktivierung von T-Lymphozyten eine sog. Kostimulation durch antigen-präsentierende Zellen nötig ist (Esensten et al. 2016). Das Fehlen dieses zweiten Signals kann zur Anergie führen, eine Hyporesponsivität nach falscher T-Zell-Rezeptor-Stimulation (ElTanbouly et Noelle 2021). Ob

solch eine Kostimulation im vorliegenden Modell möglich ist, ist fraglich. Dieser daher unerwartete Anstieg lässt eine gestörte Regulation der T-Zell-Expansion vermuten. Da der einzige Unterschied zwischen den beiden Mausstämmen das Fehlen/Vorhandensein des TRPM5-Kanals ist, kann eine immunregulatorische Funktion dieses Kanals in Betracht gezogen werden. Die erneute Vermehrung der neutrophilen Granulozyten in der Lunge bei den Wildtypen nach 7 Tagen könnte sich hingegen auch durch die Funktion der Neutrophilen als „first responder“ (Aulakh 2018) im Rahmen des hiesigen Versuchsaufbaus erklären lassen. Bei den TRPM5^{+/+}-Tieren führt die Injektion von Denatonium zu einer TRPM5-vermittelten neurogenen Entzündung, welche nach Fehlen einer kontinuierlichen Stimulation durch Antigene abebbt. Infolge des vermeintlichen Angriffs auf den Organismus steigert dieser seine akuten Abwehrkräfte: die neutrophilen Granulozyten als Effektoren der angeborenen und immediaten Immunität. Die Wildtypen, welche sämtliche normalen immunregulatorischen Elemente besitzen, stärken also mit dem leichten Anstieg an Neutrophilen nach 7 Tagen wieder ihre Abwehr (Abb. 3.26), nachdem das Knochenmark Zeit hatte, neue Immunzellen zu generieren (Basu et al. 2002). Dieser Anstieg der Neutrophilen ist homogen bei allen Tieren dieser Gruppe. Bei den TRPM5^{-/-}-Tieren fehlt dieser potenziell protektive Anstieg an sog. „first responders“. Diese Ergebnisse lassen in der Summe daher auf eine dysregulierte Immunabwehr bei den TRPM5^{-/-}-Tieren schließen.

Allerdings bestehen zwischen Lunge und Trachea Unterschiede. Insbesondere zeigen sich diese bezüglich des normalen Vorhandenseins von zahlreichen Neutrophilen in den Lungen unter Basisbedingungen, welches so in der Trachea nicht gegeben ist. In der Trachea kommt es bei den TRPM5^{-/-}-Tieren vor allem am 1. und 7. Tag nach Injektion zu einer stärkeren Erhöhung der Neutrophilen Zahlen als bei den Wildtypen (Abb. 3.10). Ob die stärkere Zunahme an Neutrophilen bei den TRPM5^{-/-}-Tieren als Zeichen einer überschießenden Immunreaktion gedeutet werden kann oder eher als eine angemessene Reaktion mit Rekrutierung der „Soldaten“ des Immunsystems, kann anhand dieser Daten nicht gesichert werden. Beide Möglichkeiten wären denkbar. Für eine klare Aussage hierzu sind zusätzliche Versuche nötig, wie zum Beispiel eine Knochenmarksanalyse. Dies könnte das Zusammenspiel zwischen Leukozytenproduktion im Knochenmark und Rekrutierung in die Atemwege darstellen. Außerdem könnte eine genauere Spezifizierung mittels FACS-Analyse oder auch Immunhistochemie hilfreich sein, um die genauen Subtypen der Leukozyten zu identifizieren und so deren genaue Funktion herauszufinden. Ebenfalls interessant wäre eine Analyse der im Verlauf vorhandenen Zytokine, um so möglicherweise besser die Ursache und die Verbindungen zwischen den Veränderungen der verschiedenen Zellpopulationen verstehen zu können.

4.1.4 B-Lymphozyten: eine Sonderstellung?

Die oben bezüglich der Neutrophilen beschriebenen Unterschiede in der Streuung finden sich bei den B-Lymphozyten in der Lunge nicht. Besonders interessant ist hier außerdem die Tatsache, dass sich bei den Wildtypen ohne Behandlung deutlich mehr B-Lymphozyten finden als bei den Knock-

Out-Mäusen. Die Möglichkeit einer Infektion der TRPM5^{+/+}-Kontrolltiere muss hierbei erwogen, denn auch wenn die Tiere ein Gesundheitszeugnis haben, ist das z.B. kein sicherer Ausschluss einer Infektion mit nicht-erfassten Erregern. Es könnte aber auch eine niedrigere „Grundaktivität“ bzw. -präsenz der B-Lymphozyten bei TRPM5^{-/-}-Tieren angenommen werden. Sehr bemerkenswert sind auch die Ergebnisse von Sakaguchi et al. (2020). Diese Arbeitsgruppe konnte regulatorische Wirkungen von TRPM5 auf B-Zellen in der B-Zell-eigenen Interleukin-Produktion nachweisen. So zeigte sich nach Stimulation von isolierten TRPM5^{-/-}-B-Zellen der Milz mit LPS eine stärkere Proliferation der B-Zellen sowie eine verstärkte Expression der Gene für IL-6 und eine daraus folgende stärkere IL-6-Ausschüttung durch die B-Zellen als bei den Wildtypen. Durch diesen Wegfall der negativen Rückkopplung in der Zytokinregulation kam es bei den TRPM5^{-/-}-Mäusen zu einer starken systemischen Inflammation mit erhöhter Mortalität. Diese Ergebnisse scheinen zunächst von den hier vorgestellten Ergebnissen abzuweichen, da wir hier eine geringere B-Lymphozyten-Zahl bei den TRPM5^{-/-}-Tieren fanden. Doch handelt es sich hierbei eben um den nicht-stimulierten Zustand. Die Studie von Sakaguchi untersucht die intrazellulären Abläufe und die Proliferation der B-Zellen nach Stimulation derselbigen mit LPS. Hierbei erfolgt nach Bindung von LPS eine Aktivierung von Calciumkanälen, wodurch es zum Calciumeinstrom in die Zelle kommt. Bei Wildtypen mit Expression von TRPM5 aktiviert die erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration den TRPM5-Kationenkanal, wodurch insbesondere der Natrium-Einstrom gefördert wird. Dies führt wiederum zu einer negativen Rückkopplung auf den Calciumkanal, welcher so inhibiert wird. Bei den TRPM5^{-/-} Zellen fehlt diese negative Rückkopplung. Es kommt weiterhin zum Calciumeinstrom mit einer nachfolgend gesteigerten NFκB-Aktivierung. Letzteres fördert die Bildung von IL-6 sowie die Proliferation der B-Lymphozyten. Der TRPM5-Kanal nimmt also als Membranprotein der B-Lymphozyten eine immunregulatorische Funktion auf die Proliferation der eigenen Zellreihe sowie auf die systemische Reaktion über die Regulation von IL-6 ein (Sakaguchi et al. 2020). Zum einen werden die einzelnen Zellen in dieser Studie also direkt stimuliert, zum anderen ist das Stimulans ein anderes, als wir es mit Denatonium verwendet haben. Außerdem muss bei unseren in-vivo Versuchen von zahlreichen anderen biologischen Einflussfaktoren ausgegangen werden (wie z.B. hormonelle Schwankungen, Temperaturschwankungen...), welche zumindest teilweise durch eine in vitro-Methodik ausgeschlossen werden. Wir stellten bei den Wildtypen einen starken Anstieg der B-Lymphozyten zwischen dem 3. und 7. Tag fest und bei den TRPM5^{-/-}-Tieren nicht. Wenn LPS und Denatonium ähnlich auf den TRPM5-Kanal wirken würden, könnte man eher das Gegenteil erwarten, da in der Studie von Sakaguchi et al. das Fehlen des TRPM5-Kanals eher zu einer stärkeren B-Lymphozyten-Proliferation geführt hat. Diese Diskrepanz kann auf die oben genannten methodischen Unterschiede zurückzuführen sein. In der vorliegenden Arbeit wurden die B-Lymphozyten schließlich nicht direkt stimuliert, sondern das tracheale Epithel. Eine solche „gleichartige“ ungehemmte Proliferation der B-Zellen wäre also nicht zu erwarten. Diese Diskrepanz ist dennoch sehr spannend und bietet die Grundlage für weitere Forschung. Essenziell ist jedoch die

Schlussfolgerung der Autoren dass der TRPM5-Kanal eine immunregulatorische Funktion hat, welche zunächst als unabhängig vom gewählten Stimulans erachtet werden kann. Die oben aufgestellte These einer immunregulatorischen Funktion des TRPM5-Kanals von Bürstenzellen wird hierdurch also stark gestützt.

Früher wurde schon eine regulatorische Funktion von TRPM4 auf die Zytokinausschüttung (IL-2) durch T-Lymphozyten nachgewiesen (Launay et al. 2004). In Zusammenschau mit dieser Literatur, lassen die vorliegenden Ergebnisse daher auf eine immunregulatorische Funktion des TRPM5-Kanals insbesondere auf die Neutrophilen-Homöostase, aber auch in Hinblick auf das Verhalten der T-Lymphozyten, schließen. Hierfür spricht insbesondere die größere Streuung der Anzahl an Neutrophilen in der Lunge der TRPM5^{-/-}-Tiere. Auch der starke Anstieg der Neutrophilen in der Trachea sowohl am 1. Tag nach Denatoniuminjektion als auch zwischen dem 3. und 7. Tag stützen diese These. Das „seltsame“ Verhalten, im Sinne eines Anstiegs, der T-Lymphozyten nach 7 Tagen bei den TRPM5^{-/-}-Tieren stützt die These einer immunregulatorischen Funktion von TRPM5 in Anbetracht der normalen Aktivierung der T-Zellen durch Antigene ebenfalls.

4.2 Die Wirkung von Denatonium auf die Entzündungsaktivität der unteren Atemwege über 7 Tage hinweg

4.2.1 Methodenkritik

In der vorliegenden Arbeit wurde Denatonium mittels einer Operation und somit Verletzung der Atemwege in die Trachea eingebracht. Es stellte sich also die Frage, ob allein der Vorgang der Injektion eine Entzündungsreaktion auslöst. In der Trachea fanden sich jedoch in der Vehikelgruppe keine höhere Anzahl an Neutrophilen oder dendritischen Zellen als in der Kontrollgruppe (vgl. Abb. 3.8 und 3.12). Dies lässt also annehmen, dass die Injektionstechnik zu keiner signifikativen Entzündung in dem untersuchten Trachea-Segment führt. Auch gab es weder bei den Bürstenzellen, den Neutrophilen oder den dendritischen Zellen einen Unterschied zwischen Wildtypen und TRPM5^{-/-}-Tieren, was eine unspezifische Wirkung von PBS als Vehikel über TRPM5 ausschließt. Wegen der Möglichkeit einer Entzündung durch die Injektion wurde auch das mittlere Trachea-Segment untersucht, um die lokale Immunreaktion auf den Einstich nicht fälschlicherweise als neurogene Entzündung zu deuten. Im Unterschied zu den Ergebnissen in der Trachea fanden sich in den Lungen sowohl deutlich höhere Zahlen an Neutrophilen als auch an B-Lymphozyten nach Inhalation von PBS (Abb. 3.25 und 3.31). Natürlich muss hierbei beachtet werden, dass die injizierten Substanzen nicht in der Trachea verbleiben, sondern letztlich aufgrund physikalischer und physiologischer Grundprinzipien vor allem in die Lungen gelangen. Das Fremdmaterial (PBS in diesem Fall) reizt also wesentlich intensiver und länger das Lungengewebe als das der Trachea. Zusätzlich kommt die bessere Durchblutung der Lungen im Vergleich zur Trachea hinzu, was natürlich eine Rekrutierung von Immunzellen erleichtert. Bei den T-Lymphozyten in der Lunge

konnte eine solche Steigerung der Zellzahlen durch die Operation nicht festgestellt werden, was möglicherweise auf die APC (antigenpräsentierende Zelle)-abhängige Aktivierung der T-Zellen zurückzuführen ist, während B-Lymphozyten selbst Antigene binden können. Ebenfalls diskutiert werden sollte in diesem Kontext die Einmaligkeit der Injektion der entsprechenden Substanzen. Studien zu längerfristigen Wirkungen von nicht-mikrobiellen Substanzen nach intratrachealer Inhalation sind selten. Jedoch findet sich diese einmalige Applikation besonders mit Kulturen von Pathogenen/Allergenen wieder (Bankova et al. 2018). Es ist daher offen, wie sich die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit verändern würden, wenn man eine mehrfache oder kontinuierliche Stimulation durchführen würde. Im Leben ergeben sich natürlicherweise verschiedene Konstellationen und auch Kontakte mit Krankheitserregern können unterschiedlicher Natur sein. So bieten die Versuche der vorliegenden Arbeit ein gutes Modell für den einmaligen Kontakt mit Erregern, wie er im Alltag oftmals stattfindet. Auch ist in Hinblick auf einen potenziellen prophylaktischen Einsatz von Denatonium die Simulation eines solchen Szenarios sinnvoll, da eben solche einmaligen Kontakte zu einer nachfolgenden Infektion führen können. Eine bestehende bakterielle Infektion beispielsweise würde aber eine kontinuierliche Stimulation darstellen. Somit wären alternative Modelle mit multiplen Injektionen möglicherweise besser geeignet, um bestimmte Parameter in Bezug auf eine längerfristige Stimulierung der Bürstenzellen darzustellen.

Bei unserer Versuchsplanung rechneten wir mit der Möglichkeit eines einseitigen Versickerns der injizierten Flüssigkeit in einen der Lungenflügel. Deshalb rechneten wir auch mit potenziellen Lobärpneumonien, weshalb bei allen Tieren beide Lungenflügel ausgewertet wurden. Hierbei fanden sich aber keine derartigen Auffälligkeiten, womit ein systematischer Fehler in Form einer einseitigen Reizung der Lunge ausgeschlossen wurde. Natürlich muss im Rahmen der Untersuchung der Entzündungsreaktion auch beachtet werden, dass in der vorliegenden Arbeit der Verlauf an jeweils unterschiedlichen Tieren beobachtet wurde. Methodisch war es nicht möglich, den Verlauf an einem einzigen Tier zu beobachten, da es um die histologische Auswertung der Gewebe ging. Dies geht mit der naturgemäß bestehenden interindividuellen Variabilität einher. Diese Variabilität findet sich sicherlich in allen untersuchten und auch in einigen nicht-untersuchten Aspekten wieder, wie beispielsweise der Anzahl der von Anfang an vorhandener Bürstenzellen, der Reaktivität dieser Bürstenzellen und auch der Immunkompetenz der einzelnen Mäuse. Solche individuellen Unterschiede wurden bereits im Zusammenhang mit Denatonium bei menschlichem sinonasalen Gewebe beschrieben (Carey et al. 2017). Diese lassen sich aber sicherlich zumindest partiell auch auf die tierexperimentellen Versuche hier übertragen.

Zusammenfassend erzeugte die alleinige Prozedur der Operation keine Entzündungsreaktion in der Trachea, jedoch aber in der Lunge.

4.2.2 Das „3-Tages-Tief“

Besondere Aufmerksamkeit in der Auswertung der Daten erhielt das „3-Tages-Tief“ der neutrophilen Granulozyten in der Trachea. Ein Tag nach Inhalation von Denatonium kommt es in

der Trachea zu einer Erhöhung der Neutrophilen-Zahlen bei beiden Mausstämmen. Diese Erhöhung entspricht unseren Theorien in Bezug auf die neurogene Entzündung, welche nach 30 min schon beobachtet wurde (noch nicht publizierte Ergebnisse der eigenen Arbeitsgruppe), und auch der schnellen Mobilisierungskapazität von Neutrophilen aus dem Blut und dem Knochenmark (Brazil et al. 2005; Furze et Rankin 2008). Hierbei ist jedoch noch anzumerken, dass im Gegensatz zu den vorherigen Versuchen mit der Auswertung nach 30 min in der vorliegenden Arbeit zu unserem Erstaunen keine nennenswerte Zahl an Neutrophilen zwischen Epithel und Lamina propria im Bereich der Hauptbronchien gefunden wurde (Abb. 3.28). Eine Möglichkeit wäre, dass die Einwanderung der Neutrophilen zwischen Epithel und Propria der Hauptbronchien nur im ganz akuten Stadium erfolgt, und es danach zu einer Migration in den Alveolarbereich kommt. Nachfolgend, am 3. Tag nach der Injektion, kommt es zu einem massiven und für uns unerwartetem Abfall der neutrophilen Granulozyten bei beiden Mausstämmen. Dies könnte auf einen vermehrten vorherigen „Verbrauch“ der Neutrophilen im Rahmen der neurogenen Entzündung zurückzuführen sein. Demnach würden die Neutrophilen nach ihrer Rekrutierung in die Trachea dort nach und nach apoptotisch. Über die Mechanismen bzw. wodurch dies geschieht, können hier nur Vermutungen geäußert werden. Diesbezüglich sind aber beispielsweise die neutrophil extracellular traps (NETs) zu nennen. Hierbei handelt es sich um ausgestoßenes Chromatin zusammen mit Granulainhalt. Der Zweck dieser Gebilde ist dann beispielsweise, Bakterien zu binden und abzutöten (Brinkmann et al. 2004). Doch die Bildung der NETs führt in vivo zum Zelltod des Granulozyten (NETosis) (Remijsen et al. 2011). Bei der genauen fluoreszenzmikroskopischen Betrachtung konnten insbesondere bei den Wildtypen der 1-Tages-Denatonium-Gruppe sehr kleine Granula-ähnliche Strukturen in unmittelbarer Nähe der Neutrophilen gefunden werden (Abb. 3.27). Möglicherweise handelt es sich hierbei um solche NETs. Um dies zu klären, wären genauere Analysen nötig, wie z.B. eine spezielle immunhistochemische Färbung (Brinkmann et al. 2016; Buhr et al. 2019). Ebenfalls interessant sind die Erkenntnisse von Kim und Mitarbeitern, welche in der Lunge Interaktionen von Neutrophilen mit B-Lymphozyten darstellen konnten. Diese Interaktionen führten letztlich zur Apoptose der Neutrophilen (Kim et al. 2018). Gewiss wurde diese Erkenntnis in der Lunge gewonnen, doch handelt es sich hierbei um ein grundsätzlich zelluläres Phänomen, bezüglich welchem nicht ausgeschlossen werden kann, dass es auch in anderen Geweben stattfindet. Auch ist die „normale“ Überlebenszeit von Neutrophilen bis dato nicht endgültig geklärt. So wurden neuere Erkenntnisse veröffentlicht, laut welchen die Neutrophilen-Überlebenszeiten sowohl beim Menschen als auch bei der Maus (12,5h) länger sind als bisher angenommen (Pillay et al. 2010). Diese Ergebnisse sind jedoch nicht endgültig und lassen aufgrund der schwierigen technischen Umstände weitere Forschung erwarten. Auch lässt sich prinzipiell die Lebenszeit der Neutrophilen durch Mediatoren wie IL-1 verlängern (Colotta et al. 1992). Etwa 3 Tage nach Denatoniuminjektion, wäre es also nötig, aus dem Knochenmark „Nachschub“ an Neutrophilen zu liefern. Da aber vermutlich diese Reserven bereits zu Beginn der Entzündungsreaktion aufgebraucht wurden, ist dies nicht sofort möglich. Am

7. Tag nach der Inhalation von Denatonium findet sich wieder ein Anstieg der Neutrophilen-Zahlen in der Trachea, welcher auf einer inzwischen erfolgten Produktion von neuen Neutrophilen im Knochenmark beruhen könnte. Die Knochenmarkstransitzeit des Menschen und des Pferds wird auf ca. 7 Tage geschätzt (Brazil et al. 2005; Dancey et al. 1976). Bei der Maus stellte sich die Transitzeit mit circa 96h etwas kürzer dar (Basu et al. 2002); dieser passt aber zu einem Anstieg der Neutrophilen erst nach mehr als 4 Tagen. Da die Entzündungsaktivität in der vorliegenden Arbeit nicht in so engen Intervallen untersucht wurde, kann man bis zu potenziellen weiteren Versuchen mit genaueren Zeitangaben die oben beschriebene Theorie aufstellen. Ebenfalls bestärkend ist, dass auch in den Lungen nach dem 1. Tag kein nennenswerter Anstieg mehr stattfindet. Dies stützt die These, dass die Knochenmarksreserven durch die provozierte neurogene Entzündung bereits nach kurzer Zeit aufgebraucht sind. Bisher wurde das „3-Tages-Tief“ nur in Bezug auf neutrophile Granulozyten besprochen. Es wäre aber denkbar, dass dieses Phänomen nicht nur Neutrophile sondern auch andere myeloische Zelltypen betrifft. Bei dendritischen Zellen hingegen konnte dieses Phänomen nicht beobachtet werden. Hierzu ist anzumerken, dass Neuropeptide wie CGRP die Motilität der dendritischen Zellen steigern (Voedisch et al. 2012). Möglicherweise führt die Ausschüttung von Neuropeptiden im Rahmen der induzierten neurogenen Entzündung zu einer verstärkten Motilität der dendritischen Zellen. Damit könnte eine verbesserte/gesteigerte Migration von aktivierten Zellen zu den lymphatischen Geweben und auch eine verbesserte „Auffüllung“ der gewebeständigen dendritischen Zellen einhergehen.

4.2.3 Die Rolle der dendritischen Zellen im Rahmen der neurogenen Entzündung

Neben dem „3-Tages-Tief“ konnten außerdem weitere Charakteristika der Denatonium-induzierten Entzündung identifiziert werden. Bleiben wir zunächst bei den dendritischen Zellen. Diese zeichneten sich durch ihr, im Vergleich zu den anderen Immunzellen, andersartiges Verhalten aus. Erste Auffälligkeit ist die hier vorhandene Normalverteilung der Zellzahlen in der Trachea in nahezu allen Gruppen. Das lässt zunächst auf ein stabileres und interindividuell gleichmäßigeres Verhalten der dendritischen Zellen im Vergleich zu den anderen Immunzellen schließen. Bei den Wildtypen fanden sich 1 Tag nach Denatoniuminjektion im Mittel 74% mehr dendritische Zellen als nach Vehikelinhalation. Dieser Unterschied ist zwar statistisch nicht signifikant, findet sich aber bei den TRPM5^{-/-}-Tieren nicht ansatzweise wieder. Das wäre mit einer Denatonium- und eventuell TRPM5-abhängigen Expansion der dendritischen Zellen vereinbar. Bei beiden Mausstämmen findet sich zudem ein Anstieg der dendritischen Zellen bis zum 3. Tag nach Injektion (Abb. 3.14). Hierbei zeigt sich aber bei den TRPM5^{+/+}-Tieren eine stetige Zunahme (auch schon von Vehikel- zu 1-Tag-Denatonium-Inhalation), während bei den TRPM5^{-/-}-Tieren der Anstieg nur vom ersten Tag post inhalationem auf den dritten Tag zu sehen ist. Auch zeigten sich beim direkten statistischen Vergleich der Gruppen mittels t-Test stärkere Signifikanzen. So finden sich im direkten Vergleich mehr dendritische Zellen bei den TRPM5^{+/+}-Tieren als bei den TRPM5^{-/-}-Tieren 1 Tag nach Bürstenzellstimulation (p=0,032). Dies ist in Zusammenschau mit den Ergebnissen der

Korrelationsanalysen weiter zu erörtern, denn auch die Bürstenzellzahl steigt bei den Wildtypen bis zum 3. Tag (Abb. 3.6). Im Rahmen letzterer konnte ein positiver linearer Zusammenhang zwischen der Anzahl an Bürstenzellen und der Anzahl an dendritischen Zellen in der Trachea festgestellt werden (Abb. 3.22). Es kommt also bei den TRPM5^{+/+}-Tieren sowohl zu einer Zunahme der Bürstenzellzahl als auch der Zahl an dendritischen Zellen in der Trachea, zusätzlich besteht eine positive Korrelation zwischen der Zunahme dieser beiden Zellzahlen. Wodurch diese Korrelation bedingt wird lässt sich anhand der vorliegenden Daten nicht sicher sagen. Natürlich ist es möglich, dass dies durch die allgemeine Entzündungsreaktion zustande kommt, im Rahmen welcher sowohl Bürstenzellen als auch dendritische Zellen expandieren. Eine Kausalität wäre aber insofern denkbar, als dass die dendritischen Zellen als „Wachposten“ dienen und Fortsätze zwischen den Epithelzellen in das Lumen strecken (Veres et al. 2011), und es nach einer durch die Bürstenzellen registrierten potentiellen Bedrohung sehr sinnvoll erscheint, auch längerfristig die einströmende Luft der Atemwege genauer zu kontrollieren. Auch werden über die Produktion von IL-25 durch die Bürstenzellen (Bankova et al. 2018) die ILC2s aktiviert (Furusawa et al. 2013), welche wiederum u.a. IL-13 ausschütten (Lloyd et Snelgrove 2018). IL-13 fördert die Migration von CD40+ dendritischen Zellen zu den Lymphknoten in der Lunge, wo sie dann eine adaptive Immunantwort in Gang setzen sollen (Halim et al. 2014). Im vorliegenden Modell werden also zunächst dendritische Zellen in die Trachea der Wildtypen rekrutiert, um dann möglicherweise über einen IL-13-geförderten Chemokingradienten (CCL21/CCR7) zu den regionalen Lymphknoten zu migrieren und dort die adaptive Immunantwort zu fördern. Dort stellen dendritischen Zellen eine wichtige Bindungsstelle zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort dar (Steinman 2006). Für genauere Interpretationen der Daten werden zusätzliche Versuche benötigt, eventuell eine genauere immunologische Typisierung der dendritischen Zellen (Swiecki et Colonna 2015).

4.2.4 Weitere Merkmale der Denatonium-induzierten Entzündung der Atemwege

Auch wurden tracheale Schnitte mit dem CD45R-/B220-Antikörper zur Darstellung der B-Lymphozyten gefärbt. Die Darstellung der B-Lymphozyten erfolgte, um auch die adaptive Immunantwort zu untersuchen, welche in einem Zeitraum von sieben Tagen erwartet werden kann. Hierbei zeigten sich bei allen Gruppen sehr wenige positive Zellen. Leicht vermehrt war die Anzahl der positiven Zellen in der 7-Tages Denatonium Gruppe der Wildtypen, wie auch in den Lungen (Abb. 3.30). Die Zählungen wurden aufgrund der niedrigen Zellzahlen bisher nicht statistisch ausgewertet. Denkbar wäre beispielsweise, dass sich bei den Wildtypen ein besseres Immungedächtnis ausbildet als bei den TRPM5^{-/-}-Tieren. Hier wäre des Weiteren eine genauere Spezifizierung der verschiedenen Arten von B- und T-Zellen zu erwägen, beispielsweise mittels FACS-Analysen. Neben den zellulären Komponenten der Entzündungsreaktion untersuchten wir auch das Vorkommen des Komplementbestandteils C3. Hierbei zeigte sich einen Tag nach Denatoniuminjektion eine stärkere Immunfluoreszenz im Bereich der Basalmembran beim Wildtypen im Vergleich zum TRPM5^{-/-}-Tier (Abb. 3.18 und Abb. 3.19). Dies entspricht auch den

noch unpublizierten Ergebnissen der eigenen Arbeitsgruppe, welche dieselbe Färbung mit Geweben nach 30 min nach Injektion durchgeführt haben. Natürlich ist die Reaktion des Komplementsystem eine kurzfristige und schnelle Angelegenheit, weshalb es sogar etwas verwunderte, dass der Unterschied noch so deutlich zu sehen war (wenn auch weniger deutlich als nach 30 min). Die Bedeutung des Komplementsystems ist einleuchtend: der Verlust des klassischen Weges des Komplementsystems führt im Rahmen einer *Streptococcus pneumoniae*-Infektion zu einer Sepsis und einer starken Störung der Makrophagenfunktion (Brown et al. 2002). Die verstärkte Aktivierung des Komplementsystems bei TRPM5^{+/+} Tieren legt also auch eine Einbindung der humoralen Komponenten des Immunsystems nahe. Die ausgelöste Immunantwort scheint also über die lokalen Maße hinaus zu gehen und potentiell auch systemische Auswirkungen zu haben.

4.2.5 Status am Ende des siebentägigen Beobachtungszeitraums

Der Beobachtungszeitraum der vorliegenden Arbeit betrug 7 Tage post inhalationem. Der Zustand am Ende dieses Zeitraums liefert die Grundlage für eventuelle folgende Versuche mit einem längerem Zeitraum. Sieben Tage nach Stimulation der trachealen Mukosa mit Denatonium finden sich in der Trachea mehr Neutrophile als beim gesunden unbehandelten Tier. Diese Beobachtung trifft sowohl auf die Wildtypen als auch auf die TRPM5^{-/-}-Tiere zu. Nach 7 Tagen finden sich im Mittel auch mehr dendritische Zellen bei beiden Mausstämmen, auch wenn sich dieser Unterschied zu den Kontrollgruppen nicht als statistisch signifikant herausstellte. In den Lungen finden sich 7 Tage nach der Operation signifikant mehr Neutrophile und B-Lymphozyten als in der Kontrollgruppe (bei beiden Mausstämmen wiederum). Insgesamt weisen diese „Endpunkte“ auf eine längere Wirkung der einmaligen Stimulation mit Denatonium hin, sowohl in der Trachea als auch in der Lunge (Kapitel 3.7). Möglicherweise trägt hierzu auch das geringe Vorhandensein der Acetylcholinesterase in den Atemwegen bei (Kummer et al. 2008). Hierdurch findet weniger Abbau von ACh statt, was zu einer längeren Wirkdauer von ACh führen könnte und somit eine länger andauernde Immunantwort unterstützen könnte. ACh fördert nämlich über die Aktivierung von Alveolarmakrophagen die Chemotaxis von Neutrophilen (Vacca et al. 2011). Um dies zu kontrollieren, wären eventuell weitere Kontrollgruppen mit Vehikelinhalation und deren Verlauf nach 3 und 7 Tagen sinnvoll, wobei nicht klar ist, ob diese Kontrollen wesentliche neue Ergebnisse liefern würden. Es ist vielmehr anzunehmen, dass das PBS innerhalb weniger Tage resorbiert wird. Außerdem können anhand der vorliegenden Ergebnisse weitere Versuche mit einer längeren Beobachtungsdauer begründet werden, da ohne lange Wirkung bzw. Auswirkung von Denatonium ein erneuter Anstieg von Immunzellen nach sieben Tagen nicht zu erklären wäre. Nach 7 Tagen finden sich bei den Wildtypen mehr Neutrophile als bei TRPM5^{-/-}-Mäusen (Abb. 3.24), was vor allem in der Zusammenschau mit den anderen Ergebnissen dieser Arbeit (u.a. zu den dendritischen Zellen und dem Komplementsystem) eine bessere Auffüllung der Neutrophilen-Reserven der Lunge und eine bessere Immunkompetenz der Wildtypen vermuten lassen kann. Diesen Ergebnissen würde

eine zeitlich zu den Versuchen abgestimmte Knochenmarksanalyse mehr Nachdruck verleihen, weil sie die hier nur vermuteten Prozesse im Knochenmark belegen könnte.

4.2.6 Die Rolle der T-Lymphozyten

In der vorliegenden Arbeit wurden die Zellarten bzw. ihre Übergruppen quantifiziert, welche mittels der Immunhistochemie ausreichend gut nachweisbar waren. Jedoch spielen viele weitere Zellarten wichtige Rollen in verschiedenen Arten von Entzündungen, weshalb ihre Bedeutung auch im Rahmen dieses Modells untersucht wurden. Die Unterteilung in angeborene und adaptive Immunität ist schließlich nicht in Stein gemeißelt: es gibt Überschneidungen und wechselseitige Beeinflussungen. So sind beispielsweise die vielfältigen T-Helferzellen zu nennen, welche sicherlich auch eine, wenn noch unbekannt, Rolle in der hier untersuchten Entzündung spielen. Besonders interessant vor allem in Bezug auf Mechanismen der Immunregulation ist zum einen das Gleichgewicht zwischen T_H17 -Zellen und T_{reg} -Zellen. T_H17 -Zellen produzieren v.a. Moleküle der IL-17-Familie und fördern die akute Entzündungsreaktion durch Rekrutierung von Neutrophilen. T_{reg} -Zellen sind die Gegenspieler, sie üben eine hemmende Wirkung auf die Entzündungsreaktion aus, indem sie inhibitorische Zytokine produzieren (Murphy K et Weaver C 2018). Wenn das Gleichgewicht dieser beiden Zellarten ins Schwanken gerät, kann es zu immunologischen Entgleisungen kommen (Lee 2018). Beide Zellarten hemmen sich gegenseitig auf Ebene der Transkriptionsfaktoren (Geng et al. 2017). Die Bedeutung dieser Zelltypen nimmt in wissenschaftlichen Kreisen zunehmend an Bedeutung zu. Ebenfalls als Binom können die T_H1 - und T_H2 -Zellen angesehen werden. Besonders im Angelsächsischen wird diesbezüglich oft von der Typ 1 und Typ 2 „Immunität“ gesprochen. Die Bedeutung dieser Begrifflichkeiten änderte sich jedoch im Laufe der letzten Jahre. Früher verstand man unter den zwei Typen, relativ getrennte Prozesse, welche unterschiedliche Zellen und anderweitige Ressourcen benötigen. In diesem früheren Konzept wird die Typ 1 Inflammation durch T_H1 -Zellen stimuliert, und führt über die Ausschüttung von IL-2, IFN- γ und TNF- β zu einer starken und charakteristischen phagozytischen Aktivität. Die Typ 2 Inflammation hingegen wird durch T_H2 -Zellen induziert, und führt über die Ausschüttung von IL-4, IL-5 und IL-13 zu hohen Antikörpertitern und einer Eosinophilie (Fahy 2015). Seit einigen Jahren entsteht nun zunehmend ein „freieres“ Konzept der Typ 1 und Typ 2 Immunreaktion. Dazu hat beigetragen, dass ILC2s, welche sich besonders beim Typ 2 wiederfinden, oft auf Abweichungen der homöostatischen Norm reagieren, anstatt immer auf spezielle Stimuli zu reagieren. Dies könnte auch erklären, warum die Typ 2 Immunität bei so vielen verschiedenen Stimuli auftritt, und auch weshalb die Typ 2 Immunität nicht als separate Einheit zu betrachten ist. So sehen Lloyd und Snelgrove die Funktion der Typ 2 Reaktion mehr als eine regulatorische Funktion in der Gewebe- und Epithelhomöostase. Es entsteht also ein neues Konzept, in dem man keine eindeutige Trennung der verschiedenen Teile des Immunsystems vornehmen kann. Die Autoren sehen die Typ 2 Immunreaktion als eine breit aufgestellte Überwachung der Grenzflächen zum Körperäußeren auf Pathogene und als mitwirkende Kraft bei der Gewebereparation (Lloyd et Snelgrove 2018). Diese

neuen Blicke auf Teile des Immunsystems sind auch dadurch von besonderem Interesse, dass die ILC2s von Bürstenzellen stimuliert werden (Bankova et al. 2018; Furusawa et al. 2013). Die Untersuchung dieser verschiedenen T-Zelltypen und ILCs mittel FACS-Analyse wäre daher auch ein weiterer Schritt, um die Funktion der Bürstenzellen zu ergründen.

4.2.7 Makrophagen in der neurogenen Entzündung

Makrophagen als essenzielle Effektorzellen der akuten Immunantwort wurden, wie in Abschnitt 3.10 dargestellt, untersucht. Hierbei zeigte sich eine Vergrößerung der Makrophagenpopulation im Lungengewebe bei den Wildtypen einen Tag nach Denatoniuminjektion, und dies sowohl in der Lectin- als auch in der F4/80-Färbung. Dies konnte bei den TRPM5^{-/-}-Tieren nicht nachgewiesen werden. 7 Tage nach der Injektion fand sich bei beiden Mausstämmen der Status quo wieder. Es scheint also, als würden im akuten Geschehen bei den TRPM5^{+/+}-Tieren mehr Makrophagen rekrutiert und auch aktiviert werden als bei den TRPM5^{-/-}-Tieren. So stellten wir bei der Testung eines neuen Antikörpers gegen den Immunzellmarker F4/80 einen wesentlichen Unterschied zwischen den beiden Mausstämmen einen Tag nach Denatoniuminjektion fest. Hierbei zeigten sich bei den TRPM5^{+/+}-Tieren besonders peribronchial und in der äußersten Lungenperipherie deutliche Ansammlungen von stark positiven Zellen (Abb. 3.38). Diese Zellen wirkten morphologisch wie dendritische Zellen zum Teil, aber teils auch wie Makrophagen. Die Makrophagen im Alveolarbereich waren hingegen nur schwach markiert. Solche F4/80-stark positiven Zellen (des Weiteren als F4/80^{hi} bezeichnet) wurden bereits zuvor beschrieben (Sheng et al. 2017). Die Autoren konnten hier Belege für die Abstammung der F4/80^{hi}-Zellen von Monozyten finden. Die F4/80^{hi}-Zellen wiesen in o.g. Studie sowohl immunologische Charakteristika von Makrophagen als auch von dendritischen Zellen auf, gleiches gilt für die Transkriptionsfaktoren. Trotz dieser teilweisen Ähnlichkeiten sehen die Autoren die F4/80^{hi}-Zellen als einen separaten Zelltyp, da im Vergleich zu zahlreichen DC- oder Makrophagensubtypen Unterschiede bspw. in der Ausstattung an CD-Antigenen vorliegen. Angesichts der ontogenetischen gemeinsamen Herkunft der DCs und der Makrophagen scheint es den Autoren auch durchaus plausibel, dass es sich um einen eigenen Subtyp mit Merkmalen verschiedener schon bekannter Zellen handelt. Besonders interessant ist auch die Tatsache, dass eine deutliche Anreicherung der F4/80^{hi}-Zellen im entzündlichen Tumormilieu nachgewiesen werden konnte. Dies würde auch den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit entsprechen, denn hier wurde ein Anstieg der F4/80^{hi}-Zellen im Rahmen einer neurogenen Entzündung beobachtet. Das vermehrte Vorkommen bei den TRPM5^{+/+}-Tieren spricht für ein TRPM5-abhängiges Geschehen und somit dafür, dass die Signalkaskade der Bürstenzellen relevant für die Rekrutierung der F4/80^{hi}-Zellen ist. Sheng et al. vermuten einen migratorischen Hintergrund der F4/80^{hi}-Zellen, was ebenfalls zu der Rekrutierung bzw. Einwanderung dieser Zellen nach Stimulation durch Denatonium in dem Fall passt. Dies ist ebenfalls vereinbar mit der ursprünglich vermuteten besseren Immunkompetenz der Wildtypen. Um die Rolle und die Wichtigkeit der Makrophagen in dem vorliegenden Versuchsmodell genauer zu definieren, ist eine Quantifizierung

nötig. Angesichts all dieser Aspekte scheint es wichtig die Denatonium-induzierte Entzündungsreaktion weiter zu charakterisieren; hierzu würde sich beispielsweise eine FACS-Analyse des Lungengewebes oder einer bronchoalveolären Lavage anbieten. Somit könnten die exakten Subtypen von verschiedenen Zellarten und deren entsprechende Funktion besser im Kontext der Denatonium-induzierten neurogenen Entzündung situiert werden. So gibt es beispielsweise proinflammatorische und immunsuppressive Arten von Makrophagen (Headland et Norling 2015), welche natürlich verschiedene Funktionen einnehmen. Daher wäre es interessant zu wissen, ob die anscheinende Vergrößerung der Makrophagenpopulation bei den TRPM5^{+/+}-Tieren eher pro- oder antiinflammatorisch zu deuten ist.

4.3 Die Wirkung von Denatonium auf die Bürstenzellen der Trachea

4.3.1 Bürstenzellen als Sensoren für Denatonium - ihre Charakteristika

Die vorliegende Arbeit gründet auf vorausgegangenen Versuchen, welche eine akute neurogene Entzündung 30 min nach trachealer Stimulation mit Denatonium nachweisen konnten (noch nicht publiziert aus der eigenen Arbeitsgruppe). In dieser Arbeit konnte eine Substanz P-abhängige Plasmaextravasation und Neutrophilenrekrutierung nach Denatoniuminhalation gezeigt werden, während CGRP vor allem die Vasodilatation vermittelte. Auch der Komplementsystembestandteil C3 wurde vermehrt bei den TRPM5^{+/+}-Tieren im Bereich der Lamina propria gefunden, 30 min nach Denatoniumstimulation (vgl. Abb. 3.18 und 3.19, C3 ein Tag nach Denatoniuminhalation). Es konnte zuvor nachgewiesen werden, dass unter anderem der Tas2R108 eine Spezifität gegenüber Denatonium aufweist (Krsteva et al. 2012b). Daher besteht auch eine Reaktivität der Bürstenzellen, auf diese Bittersubstanz, welche über den TRPM5-Kanal vermittelt wird. Die Idee, dass Bürstenzellen eine wichtige Rolle für das Leben spielen, wird bereits durch den Nachweis dieser Zellart in primitiven Lebensformen unterstützt (Kotrschal et Whitear 1988). Es handelt sich bei der Bürstenzelle also um eine phylogenetisch stark konservierte Zellart mit sensorischer Funktion. Die Idee wird auch dadurch gestützt, dass Bürstenzellen sich in zahlreichen Organen wiederfinden (Deckmann et al. 2014; Iseki et Kondo 1990; Luciano et al. 1981; Trier et al. 1987).

Um die Wirkung von Denatonium auf die Anzahl der trachealen Bürstenzellen zu untersuchen, wurden diese anhand von histologischen Schnitten gezählt. Diese Zählung fand „händisch“ am Fluoreszenzmikroskop statt. Angesichts der Fehlerhaftigkeit des Menschen und somit des Experimentators, ist von einer gewissen Ungenauigkeit auszugehen. Diskrepanzen in der Quantifizierung von Bürstenzellen finden sich aber auch schon in frühen Publikationen. So gibt es vielfältige Einschätzungen zur Prävalenz von Bürstenzellen in den Atemwegen (Chang et al. 1986; Jeffery et Reid 1975; Luciano et al. 1968; Meyrick et Reid 1968). Um eine möglichst gute Vergleichbarkeit und Wiederholbarkeit der Ergebnisse zu erzielen wurden die Zählungen auf eine fest definierte Art und Weise durchgeführt. Um Doppelzählungen sicher zu vermeiden wurde ein

Abstand von 200µm zwischen den Schnitten eines Tieres eingehalten. Die fälschliche Beurteilung der durch die Injektion hervorgerufenen lokalen Entzündung im kranialen Tracheadrittel wurde durch die Selektion des mittleren Tracheaabschnitts vermieden. Die Zellzahl wurde pro Trachearing angegeben, was durch die Darstellung aller Abschnitte (inkl. des Paries membranaceus) ein repräsentatives und gut vergleichbares Ergebnis liefert. Die angewandte Methode ermöglicht außerdem eine Hochrechnung der Zellzahl bezogen auf eine Fläche, was die Validität und Genauigkeit dieser Methodik hervorhebt. Es werden jedoch auch heute noch neue Methoden zur besseren Quantifizierung von Bürstenzellen entwickelt, da die bisherigen Methoden nicht immer zuverlässig genug waren (Ualiyeva et al. 2019).

Die Abwesenheit des TRPM5-Kanals bei den TRPM5^{-/-}-Tieren wurde anhand von immunhistochemischen Färbungen mit Antikörpern gegen TRPM5 bestätigt (siehe Abb. 3.2). Zur Darstellung der Bürstenzellen wurde des Weiteren ein Antikörper gegen die DCAMKL1 (Bankova et al. 2018; Gerbe et al. 2009) verwendet, welcher neben Bürstenzellen auch Nervenfasern anfärbte. Dieser Antikörper wurde ausgewählt, um eine einheitliche Quantifizierung auch bei TRPM5^{-/-}-Tieren zu ermöglichen. DCAMKL1 ist einer von mehreren verwendbaren immunhistochemischen Bürstenzell-Markern, zu denen auch natürlich TRPM5 zählt sowie GNAT3 oder PLCβ2. Diese Marker entsprechen auch den anhand von Einzelzellsequenzierung nachgewiesenen Bürstenzellspezifischen Genen wie Tas2r108, Trpm5, Chat, Avil, Dclk1, Sox9 und Pou2f3 (Hollenhorst et al. 2020). Insbesondere die Marker und Gene, welche an der Geschmackssignalkaskade beteiligt sind, heben nochmals die sensorische Rolle der Bürstenzellen hervor. Der TRPM5-Kanal als essenzieller Bestandteil dieser Kaskade ermöglicht also die sensorische Funktion der Bürstenzellen. In der vorliegenden Arbeit wurden daher TRPM5^{-/-}-Tiere als Kontrollen verwendet, um die sensorische Funktion und die daraus resultierenden Folgen zu untersuchen.

4.3.2 Expansion der Bürstenzellen bei den TRPM5^{+/+}-Tieren

Für eine gute Vergleichbarkeit wurden die in-vivo Versuche wiederholt durchgeführt, wodurch auch eine höhere Relevanz der Ergebnisse und eine bessere Reproduzierbarkeit erreicht wurden. Besonders interessant in Hinblick auf die Fragestellung der vorliegenden Arbeit ist der signifikante Unterschied der Bürstenzellzahlen zwischen der Vehikelgruppe und der 3-Tages Denatonium-Gruppe bei den Wildtypen, welcher bei den TRPM5^{-/-}-Tieren nicht festgestellt wurde. Es scheint also nach Denatoniuminjektion in die Trachea zu einer Zunahme der Bürstenzellzahlen zu kommen, welche im Mittel 89% im Vergleich zur Vehikelgruppe beträgt. Bestärkend kommt hinzu, dass sich eine steigende Tendenz bis zum 3. Tag erkennen lässt (Abb. 3.6). Die Stimulation mit Denatonium führt nach aktuellem Wissenstand (Hollenhorst et al. 2020) zu einer Freisetzung von ACh. Ob diese Freisetzung von ACh in kausalem Zusammenhang mit der „Bürstenzell-Vermehrung“ steht, ist nicht gesichert, jedoch ermöglichen die vorliegenden Ergebnisse die Aufstellung einer solchen These. Im Jahre 2003 zeigten Song und Mitarbeiter, dass das kleinzellige Bronchialkarzinom der Synthese, der Sekretion und des Abbaus von ACh fähig ist. Vor allem aber konnte gezeigt werden, dass das ACh

das Wachstum der tumoreigenen Zellen stimuliert und somit eine autokrine Schleife darstellt (Song et al. 2003). Die Möglichkeit eines autokrinen Feedbacks im Rahmen der in der vorliegenden Arbeit untersuchten neurogenen Entzündung wurde daher auch erwogen. Ergebnisse der eigenen Arbeitsgruppe konnten diese Vermutung eines autokrinen Feedback-Mechanismus der Bürstenzellreaktion auf Denatonium erhärten. So konnte durch Inhibition der ACh-Rezeptoren M1R und M3R die Bürstenzellreaktion auf Denatonium gehemmt werden, während sie bei Inhibition von M2R gesteigert wurde. Dies lies also auf einen positiven autokrinen Feedback Mechanismus mittels M1R und M3R sowie auf einen negativen mittels M2R schließen. Die Aktivierung der Bürstenzellen der Trachea scheint also zumindest teilweise einer sekundären Aktivierung über die mAChR zu laufen (Hollenhorst et al. 2020). Möglich wäre daher aber auch eine autokrine Förderung der Expansion der eigenen Zellreihe durch die Bürstenzellen. Bezüglich der Wirkung von ACh auf das Vorkommen von Bürstenzellen wurden kürzlich weitere Ergebnisse publiziert. So beschreiben Middelhoff et al. eine Expansion der intestinalen Bürstenzellen nach Blockade von mAChR. Es ergibt sich die Vermutung, dass durch diese Blockade die Zellen das ACh nicht mehr „wahrnehmen“ können und infolgedessen von einem verminderten ACh-Spiegel „ausgehen“. In Anbetracht der Tatsache, dass Bürstenzellen selbst die Ausschüttung von ACh steigern können (Middelhoff et al. 2020), wäre die beobachtete Expansion daher eine logische Reaktion des Organismus auf eine vermeintlich veränderte Umgebung. So liegt dann ein ACh-Mangel vor, zu dessen Behebung die Bürstenzellen beitragen könnten. Eine negative Feedback-Schleife hingegen konnte bei den urethralen Bürstenzellen festgestellt werden. Hier zeigten die Autoren, dass die mAChR-Typen M2 und M5 die Reaktivität der Bürstenzellen über negatives Feedback inhibieren (Deckmann et al. 2018). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen (durch die nachgewiesene Expansion der TRPM5-besitzenden Bürstenzellen) hingegen eher auf einen positiven Feedback-Mechanismus, wie auch von Hollenhorst et. al. (2020) beschrieben, schließen. Auch konnte kürzlich gezeigt werden, dass die Geschmackssinneszellen der Zunge neben dem bereits bekannten ATP als Transmitter auch ACh sezernieren (Dando et Roper 2012). Das ACh steigert Geschmacks-induzierten Reaktionen und die ATP-Freisetzung. Hier findet also ein positives autokrines Feedback statt. Auch in der Lunge gibt es Zeichen für das Vorhandensein einer positiven Rückkopplung. So zeigten Rane et al., dass es nach repetitiver Stimulation der SCCs mit Denatonium und Succinat zu einer nennenswerten Expansion der DCAMKL1-positiven SCCs kam (Rane et al. 2019).

Kürzlich konnte zudem gezeigt werden, dass Zellen mit TRPM5-Kanal die Proliferation von lokalen Zellen (in dem Fall des olfaktorischen Epithels) regulieren und fördern können (Lemons et al. 2020). Dies ist in Zusammenhang mit neuen Ergebnissen zur Entwicklung von trachealen Bürstenzellen zu betrachten. Diesbezüglich konnte eine TLR2/TLR4/MyD88-abhängige Expansion von Bürstenzellen gezeigt werden, welche außerdem schon pränatal vorhanden sind und postnatal weiter expandieren (Perniss et al. 2021). Diese neuen Erkenntnisse stützen also die These einer teils autokrin geförderten Expansion der Bürstenzellen.

Der in der vorliegenden Arbeit beschriebene zeitliche Verlauf mit einer Expansion der Bürstenzellen nach 3 Tagen ist in Hinblick auf andere Ergebnisse stimmig. So zeigte sich in anderen Studien ebenfalls eine Expansion der Bürstenzellen 3 Tage nach einer einmaligen Inhalation mit dem Allergen *Alternaria* (Bankova et al. 2018). Diese Übereinstimmung stützt also die Ergebnisse dieser Arbeit in ihrer Plausibilität. Bei den TRPM5^{-/-}-Tieren wurde zwischen keiner der Gruppen ein signifikanter Unterschied gefunden. Dies lässt zunächst die Vermutung zu, dass die intrazelluläre Signalweiterleitung des wahrgenommenen Stimulans TRPM5-abhängig ist. Die vorliegenden Ergebnisse führen also zu der berechtigten Annahme, dass die Expansion der Bürstenzellen nach Stimulation mit Denatonium abhängig vom TRPM5-Kanal ist.

4.3.3 Ausblick: eine klinische Anwendung?

Die ursprüngliche Idee der vorliegenden Arbeit war es, eine Art immunologischen Schutzring in der Trachea aufzubauen. Dieser sollte potenzielle Eindringlinge/Pathogene abwehren, bevor es zu einer Infektion der Lungen kommt. Für ein solches Vorhaben wäre eine länger andauernde neurogene Entzündung in der Trachea wichtig. Eine solche konnte in dieser Form nicht bewirkt werden. Um solch eine längerfristige Reaktion zu erlangen, kommen verschiedene potenzielle Lösungsansätze in Betracht. Zum einen sollte die Wirkung von mehrfachen Injektionen evaluiert werden. Zum anderen ist prinzipiell eine chemische Veränderung der molekularen Struktur von Denatonium denkbar. Wesentlich für eine klinische Anwendbarkeit wäre neben der längerfristigen Persistenz der Wirkung auch die patientenfreundliche Applikationsart. Eine wöchentliche tracheale Injektion oder Intubation ist kaum denkbar. Eine Inhalation mittels Spacer, beispielsweise wie in der Therapie des chronischen Asthma bronchiale, hingegen wäre es schon. Hierbei wäre die Tiefe der Inhalation der Partikel zu bedenken, also bis in welche Tiefe der Atemwege die Partikel gelangen. Ein Erreichen der Lunge würde vermutlich zu einer dauerhaften Entzündung führen, die nicht erstrebenswert ist. Für dieses Problem müsste also auch eine Lösung gefunden werden. Möglicherweise wäre auch hier die Zusammenarbeit mit einem chemischen Institut hilfreich. Von besonderem Interesse könnte auch die Fokussierung auf die Auswirkungen von Denatonium auf die dendritischen Zellen sein, welche als Antigen-präsentierende Zellen eine Impfungs-ähnliche Wirkung vermitteln könnten. Dies hätte gerade in der aktuellen Zeit sehr interessant sein können, eine Massenimpfung gegen Covid-19 durch Inhalation und Aktivierung der Atemwegs-DCs zu verabreichen. Ebenfalls zu überdenken und in weiteren Versuchen zu evaluieren ist die Konzentration des injizierten Denatoniums. Die hier angewandte Konzentration stammt aus der Erfahrung aus kürzeren Versuchen, möglicherweise wäre für die Langzeitanwendung eine andere Konzentration besser. Natürlich sind auch mögliche unerwünschte Nebenwirkungen, wie z.B. die Apoptose von anderen Epithelzellen (Wen et al. 2015) zu ergründen. Solche Wirkungen müssen auch genauer erforscht und evaluiert werden. Besonderes Augenmerk sollte in Zukunft auf die vermutete immunregulatorische Funktion der Bürstenzellen dank des TRPM5-Kanals gelegt werden, vor allem, da es Erkrankungen der Atemwege gibt, welche

pathophysiologisch auf eine Hyperaktivität des Immunsystems zurückzuführen sind (nicht zuletzt das weitverbreitete Asthma bronchiale).

Interessanterweise wurde kürzlich der genaue Aufbau und der präzise Funktionsmechanismus des TRPM5-Kanals von Zebrafischen untersucht. Hierbei konnten zwei verschiedene Bindestellen für Calcium identifiziert werden. Zum einen die auch bei anderen TRP-Kanälen bekannte Bindestelle (Ca_{TMD}) an den S1-S4 Domänen, welche der Aktivierung des TRPM5-Kanals dient. Zum anderen eine neue und bisher nur hier bekannte Bindestelle an der Melastatin-Domäne (MHR1/2 und MHR3/4). Diese neue als Ca_{ICD} bezeichnete Bindestelle dient der Modulierung der Spannungsabhängigkeit des Kanals sowie auch der Förderung der Calciumbindung an Ca_{TMD} (Ruan et al. 2021). Das Wissen aus solchen Studien zum strukturellen Aufbau, in Kombination mit pharmakologischer Expertise und dem durch die vorliegende Arbeit u.a. erweiterte Wissen über die Funktion des TRPM5-Kanals könnten in Zukunft den Grundstein für neue Therapien darstellen. Die komplexen und vielseitigen Funktionen der trachealen Bürstenzellen und des TRPM5-Kanals sollten auch in anderen Bereichen der Medizin evaluiert werden.

Bibliographie

1. Akdis M, Aab A, Altunbulakli C, Azkur K, Costa RA, Cramer R, Duan S, Eiwegger T, Eljaszewicz A, Ferstl R, Frei R, Garbani M, Globinska A, Hess L, Huitema C, Kubo T, Komlasi Z, Konieczna P, Kovacs N, Kucuksezer UC, Meyer N, Morita H, Olzhausen J, O'Mahony L, Pezer M, Prati M, Rebane A, Rhyner C, Rinaldi A, Sokolowska M, Stanic B, Sugita K, Treis A, van de Veen W, Wanke K, Wawrzyniak M, Wawrzyniak P, Wirz OF, Zakzuk JS, Akdis CA (2016), Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor β , and TNF- α : Receptors, functions, and roles in diseases. *The Journal of allergy and clinical immunology* 138:984–1010
2. Amulic B, Cazalet C, Hayes GL, Metzler KD, Zychlinsky A (2012), Neutrophil Function: From Mechanisms to Disease. *Annual Review of Immunology* 30:459–489
3. Arastéh K et al. (2018), *Innere Medizin*. 4. Auflage. Thieme, Stuttgart
4. Ashina K, Tsubosaka Y, Nakamura T, Omori K, Kobayashi K, Hori M, Ozaki H, Murata T (2015), Histamine Induces Vascular Hyperpermeability by Increasing Blood Flow and Endothelial Barrier Disruption In Vivo. *PloS one* 10:e0132367
5. Audrit KJ, Delventhal L, Aydin Ö, Nassenstein C (2017), The nervous system of airways and its remodeling in inflammatory lung diseases. *Cell and tissue research* 367:571–590
6. Aulakh GK (2018), Neutrophils in the lung: "the first responders". *Cell and tissue research* 371:577–588
7. Bahmani B, Uehara M, Jiang L, Ordikhani F, Banouni N, Ichimura T, Solhjoui Z, Furtmüller GJ, Brandacher G, Alvarez D, Andrian UH von, Uchimura K, Xu Q, Vohra I, Yilmam OA, Haik Y, Azzi J, Kasinath V, Bromberg JS, McGrath MM, Abdi R (2018), Targeted delivery of immune therapeutics to lymph nodes prolongs cardiac allograft survival. *The Journal of clinical investigation* 128:4770–4786
8. Bajic G, Degn SE, Thiel S, Andersen GR (2015), Complement activation, regulation, and molecular basis for complement-related diseases. *The EMBO journal* 34:2735–2757
9. Baluk P, Nadel JA, McDonald DM (1992), Substance P-immunoreactive sensory axons in the rat respiratory tract: A quantitative study of their distribution and role in neurogenic inflammation. *The Journal of comparative neurology* 319:586–598
10. Baluk P, Bertrand C, Geppetti P, McDonald DM, and J. A. Nadel (1995), NK1 receptors mediate leukocyte adhesion in neurogenic inflammation in the rat trachea. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 268:L263-L269
11. Bankova LG, Dwyer DF, Yoshimoto E, Ualiyeva S, McGinty JW, Raff H, Moltke J von, Kanaoka Y, Frank Austen K, Barrett NA (2018), The cysteinyl leukotriene 3 receptor regulates expansion of IL-25-producing airway brush cells leading to type 2 inflammation. *Science immunology* 3:1–24
12. Basu S, Hodgson G, Katz M, Dunn AR (2002), Evaluation of role of G-CSF in the production, survival, and release of neutrophils from bone marrow into circulation. *Blood* 100:854–861
13. Behrends JC et al. (2017), *Physiologie*. 3. Auflage. Thieme, Stuttgart
14. Bezençon C, Fürholz A, Raymond F, Mansourian R, Métairon S, Le Coutre J, Damak S (2008), Murine intestinal cells expressing Trpm5 are mostly brush cells and express markers of neuronal and inflammatory cells. *The Journal of comparative neurology* 509:514–525

15. Bochud P-Y, Moser F, Erard P (2001), Community-acquired Pneumonia. *Medicine* 80:75–87
16. Brandes R et al. (2019), *Physiologie des Menschen*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg
17. Braun T, Mack B, Kramer MF (2011), Solitary chemosensory cells in the respiratory and vomeronasal epithelium of the human nose: a pilot study. *Rhinology* 49:507–512
18. Brazil TJ, Dagleish MP, McGorum BC, Dixon PM, Haslett C, Chilvers ER (2005), Kinetics of pulmonary neutrophil recruitment and clearance in a natural and spontaneously resolving model of airway inflammation. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 35:854–865
19. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A (2004), Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science (New York, N.Y.)* 303:1532–1535
20. Brinkmann V, Abu Abed U, Goosmann C, Zychlinsky A (2016), Immunodetection of NETs in Paraffin-Embedded Tissue. *Frontiers in immunology* 7:513
21. Brody AR, Roe MW (1983), Deposition pattern of inorganic particles at the alveolar level in the lungs of rats and mice. *The American review of respiratory disease* 128:724–729
22. Brokaw JJ, McDonald DM (1988), Neurally mediated increase in vascular permeability in the rat trachea: onset, duration, and tachyphylaxis. *Experimental lung research* 14:757–767
23. Brown JS, Hussell T, Gilliland SM, Holden DW, Paton JC, Ehrenstein MR, Walport MJ, Botto M (2002), The classical pathway is the dominant complement pathway required for innate immunity to *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. *PNAS* 99:16969–16974
24. Buhr N de, Bonilla MC, Pfeiffer J, Akhdar S, Schwennen C, Kahl BC, Waldmann K-H, Valentin-Weigand P, Hennig-Pauka I, Köckritz-Blickwede M von (2019), Degraded neutrophil extracellular traps promote the growth of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Cell death & disease* 10:657
25. Carey RM, Workman AD, Hatten KM, Siebert AP, Brooks SG, Chen B, Adappa ND, Palmer JN, Kennedy DW, Lee RJ, Cohen NA (2017), Denatonium-induced sinonasal bacterial killing may play a role in chronic rhinosinusitis outcomes. *International forum of allergy & rhinology* 7:699–704
26. Carman CV, Springer TA (2004), A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them. *The Journal of cell biology* 167:377–388
27. Chandrashekar J (2000), T2Rs function as Bitter taste receptor. *Cell* 100:703–711
28. Chandrashekar J, Müller KL, Hoon MA, Adler E, Feng L, Guo W, Zuker CS, Ryba NJP (2000), T2Rs Function as Bitter Taste Receptors. *Cell*. 100:703–711
29. Chang L-Y, Mercer R, Crapo JD (1986), Differential distribution of brush cells in the rat lung. *The anatomical record* 216:49–54
30. Chastre J, Dugard A (2010), A Pilot Study of the humaneered™ Anti-PcrV monoclonal Antibody, KB001, in mechanically-ventilated (MV) subjects colonized with *Pseudomonas aeruginosa*. *American journal of respiratory and critical care medicine* 181
31. Choi JE, Di Nardo A (2018), Skin neurogenic inflammation. *Seminars in immunopathology* 40:249–259

32. Clapp TR, Stone LM, Margoleske RF, Kinnamon SC (2001), Immunocytochemical evidence for co-expression of Type III IP3 receptor with signaling components of bitter taste transduction. *BMC Neuroscience* 2:o. S.
33. Clapp TR, Trubey KR, Vandenbeuch A, Stone LM, Margolskee RF, Chaudhari N, Kinnamon SC (2008), Tonic activity of Galpha-gustducin regulates taste cell responsivity. *FEBS letters* 582:3783–3787
34. Clària J, Lee MH, Serhan CN (1996), Aspirin-Triggered Lipoxins (15-epi-LX) Are Generated by the Human Lung Adenocarcinoma Cell Line (A549)- Neutrophil Interactions and Are Potent Inhibitors of Cell Proliferation. *Molecular Medicine* 2:583–596
35. Colotta F, Re F, Polentarutti N, Sozzani S, Mantovani A (1992), Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood* 80:2012–2020
36. Damak S, Rong M, Yasumatsu K, Kokrashvili Z, Pérez CA, Shigemura N, Yoshida R, Mosinger B, Glendinning JI, Ninomiya Y, Margolskee RF (2006), Trpm5 null mice respond to bitter, sweet, and umami compounds. *Chemical senses* 31:253–264
37. Dancey JT, Deubelbeiss KA, Harker LA, Finch CA (1976), Neutrophil kinetics in man. *The Journal of clinical investigation* 58:705–715
38. Dando R, Roper SD (2012), Acetylcholine is released from taste cells, enhancing taste signalling. *The Journal of physiology* 590:3009–3017
39. Deckmann K, Filipski K, Krasteva-Christ G, Fronius M, Althaus M, Rafiq A, Papadakis T, Renno L, Jurastow I, Wessels L, Wolff M, Schütz B, Weihe E, Chubanov V, Gudermann T, Klein J, Bschleipfer T, Kummer W (2014), Bitter triggers acetylcholine release from polymodal urethral chemosensory cells and bladder reflexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111:8287–8292
40. Deckmann K, Krasteva-Christ G, Rafiq A, Herden C, Wichmann J, Knauf S, Nassenstein C, Grevelding CG, Dorresteyn A, Chubanov V, Gudermann T, Bschleipfer T, Kummer W (2015), Cholinergic urethral brush cells are widespread throughout placental mammals. *International immunopharmacology* 29:51–56
41. Deckmann K, Rafiq A, Erdmann C, Illig C, Durschnabel M, Wess J, Weidner W, Bschleipfer T, Kummer W (2018), Muscarinic receptors 2 and 5 regulate bitter response of urethral brush cells via negative feedback. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 32:2903–2910
42. Dehkordi O, Rose JE, Balan KV, Millis RM, Bhatti B, Jayam-Trouth A (2010), Co-expression of nAChRs and molecules of the bitter taste transduction pathway by epithelial cells of intrapulmonary airways. *Life sciences* 86:281–288
43. Dennis EA, Norris PC (2015), Eicosanoid storm in infection and inflammation. *Nature reviews. Immunology* 15:511–523
44. DiMaio MF, Dische R, Gordon RE, Kattan M (1988), Alveolar brush cells in an infant with desquamative interstitial pneumonitis. *Pediatric Pulmonology* 4:185–191
45. DiMaio MF, Meyer K (1990), Brush cells in the human fetal trachea. *Pediatric Pulmonology* 8:40–44
46. Dimopoulos G, Kollef MH, Cohen J (2016), In 2035, will all bacteria be multiresistant? Yes. *Intensive care medicine* 42:2014–2016

47. Doeing DC, Borowicz JL, Crockett ET (2003), Gender dimorphism in differential peripheral blood leukocyte counts in mice using cardiac, tail, foot, and saphenous vein puncture methods. *BMC Clinical Pathology* 3:o.S.
48. ElTanbouly MA, Noelle RJ (2021), Rethinking peripheral T cell tolerance: checkpoints across a T cell's journey. *Nature reviews. Immunology* 21:257–267
49. Esensten JH, Helou YA, Chopra G, Weiss A, Bluestone JA (2016), CD28 Costimulation: From Mechanism to Therapy. *Immunity* 44:973–988
50. Fahy JV (2015), Type 2 inflammation in asthma - present in most, absent in many. *Nature reviews. Immunology* 15:57–65
51. Feng D, Nagy JA, Pyne K, Dvorak HF, Dvorak AM (1998), Neutrophils Emigrate from Venules by a Transendothelial Cell Pathway in Response to FMLP. *The Journal of experimental medicine* 187:903–915
52. Finger TE, Böttinger B, Hansen A, Anderson KT, Silver WL (2003), Solitary chemoreceptor cells in the nasal cavity serve as sentinels of respiration. *PNAS* 100:8981–8986
53. Finger TE, Danilova V, Barrows J, Bartel DL, Vigers AJ, Stone L, Hellekant G, Kinnamon SC (2005), ATP signaling is crucial for communication from taste buds to gustatory nerves. *Science* 310:1495–1499
54. Fischer A, Canning BJ, Udem BJ, Kummer W (1998), Evidence for an esophageal origin of VIP-IR and NO synthase-IR nerves innervating the guinea pig trachealis: A retrograde neuronal tracing and immunohistochemical analysis. *The Journal of comparative neurology* 394:326–334
55. Flannagan RS, Jaumouillé V, Grinstein S (2012), The cell biology of phagocytosis. *Annual review of pathology* 7:61–98
56. Fleig A, Penner R (2004), The TRPM ion channel subfamily: molecular, biophysical and functional features. *Trends in pharmacological sciences* 25:633–639
57. Foxman EF, Campbell JJ, Butcher EC (1997), Multistep Navigation and the Combinatorial Control of Leukocyte Chemotaxis. *The Journal of cell biology* 139:1349–1360
58. Freund JR, Lee RJ (2018), Taste receptors in the upper airway. *World journal of otorhinolaryngology - head and neck surgery* 4:67–76
59. Furusawa J, Moro K, Motomura Y, Okamoto K, Zhu J, Takayanagi H, Kubo M, Koyasu S (2013), Critical role of p38 and GATA3 in natural helper cell function1. *Journal of immunology* 191:1818–1826
60. Furze RC, Rankin SM (2008), Neutrophil mobilization and clearance in the bone marrow. *Immunology* 125:281–288
61. Geng J, Yu S, Zhao H, Sun X, Li X, Wang P, Xiong X, Hong L, Xie C, Gao J, Shi Y, Peng J, Johnson RL, Xiao N, Lu L, Han J, Zhou D, Chen L (2017), The transcriptional coactivator TAZ regulates reciprocal differentiation of TH17 cells and Treg cells. *Nature immunology* 18:800–812
62. George A, Rath S, Shroff KE, Wang M, Durdik JM (1994), Ligation of CD45 on B cells can facilitate production of secondary Ig isotypes. *The Journal of Immunology* 152:1014–1021

63. Gerbe F, Brulin B, Makrini L, Legraverend C, Jay P (2009), DCAMKL-1 expression identifies Tuft cells rather than stem cells in the adult mouse intestinal epithelium. *Gastroenterology* 137:2179-80; author reply 2180-1
64. Goo E, An JH, Kang Y, Hwang I (2015), Control of bacterial metabolism by quorum sensing. *Trends in microbiology* 23:567–576
65. Gordon RE, Kattan M (1984), Absence of cilia and basal bodies with predominance of brush cells in the respiratory mucosa from a patient with immotile cilia syndrome. *Ultrastructural pathology* 6:45–49
66. Grommes J, Soehnlein O (2011), Contribution of neutrophils to acute lung injury. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)* 17:293–307
67. Gulbransen B, Finger TE (2005), Solitary Chemoreceptor Cell Proliferation in Adult Nasal Epithelium. *Journal of neurocytology* 34:117–122
68. Gulbransen B, Silver W, Finger TE (2008), Solitary chemoreceptor cell survival is independent of intact trigeminal innervation. *The Journal of comparative neurology* 508:62–71
69. Haass M, Skofitsch G (1985), Cardiovascular effects of calcitonin gene-related peptide in the pithed rat: comparison with substance P. *Life sciences* 37:2085–2090
70. Halim TYF, Steer CA, Mathä L, Gold MJ, Martinez-Gonzalez I, McNagny KM, McKenzie ANJ, Takei F (2014), Group 2 Innate Lymphoid Cells Are Critical for the Initiation of Adaptive T Helper 2 Cell-Mediated Allergic Lung Inflammation. *Immunity* 40:425–435
71. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P (2004), Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature reviews. Microbiology* 2:95–108
72. Hathcock KS, Hirano H, Murakami S., Hodes RJ (1992), CD45 expression by B cells. Expression of different CD45 isoforms by subpopulations of activated B cells. *The Journal of Immunology* 149:2286–2294
73. Headland SE, Norling LV (2015), The resolution of inflammation: Principles and challenges. *Seminars in immunology* 27:149–160
74. Hecht I, Rong J, Sampaio ALF, Hermesh C, Rutledge C, Shemesh R, Toporik A, Beiman M, Dassa L, Niv H, Cojocaru G, Zauberman A, Rotman G, Perretti M, Vinten-Johansen J, Cohen Y (2009), A novel peptide agonist of formyl-peptide receptor-like 1 (ALX) displays anti-inflammatory and cardioprotective effects. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 328:426–434
75. Hijiya K, Okada Y, Tankawa H (1977), Ultrastructural Study of the Alveolar Brush Cell. *Journal of Electronic Microscopy* 26:321–329
76. Höfer D, Drenckhahn D (1996), Taste receptor-like cells in the rat gut identified by expression of alpha-gustducin. *PNAS* 93:6631–6634
77. Hofmann T, Chubanov V, Gudermann T, Montell C (2003), TRPM5 Is a Voltage-Modulated and Ca²⁺-Activated Monovalent Selective Cation Channel. *Current Biology* 13:1153–1158
78. Hollenhorst MI, Lips KS, Wolff M, Wess J, Gerbig S, Takats Z, Kummer W, Fronius M (2012), Luminal cholinergic signalling in airway lining fluid: a novel mechanism for activating chloride secretion via Ca²⁺-dependent Cl⁻ and K⁺ channels. *British journal of pharmacology* 166:1388–1402

79. Hollenhorst MI, Jurastow I, Nandigama R, Appenzeller S, Li L, Vogel J, Wiederhold S, Althaus M, Empting M, Altmüller J, Hirsch AKH, Flockerzi V, Canning BJ, Saliba A-E, Krasteva-Christ G (2020), Tracheal brush cells release acetylcholine in response to bitter tastants for paracrine and autocrine signaling. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 34:316–332
80. Hoon MA, Adler E, Lindemeier J, Battey JF, Ryba NJP, Zuker CS (1999), Putative Mammalian Taste Receptors: A Class of Taste-Specific GPCRs with Distinct Topographic Selectivity. *Cell* 96:541–551
81. Hoshino A, Nagao T, Nagi-Miura N, Ohno N, Yasuhara M, Yamamoto K, Nakayama T, Suzuki K (2008), MPO-ANCA induces IL-17 production by activated neutrophils in vitro via classical complement pathway-dependent manner. *Journal of Autoimmunity* 31:79–89
82. Hostettler N, Bianchi P, Gennari-Moser C, Kassahn D, Schoonjans K, Corazza N, Brunner T (2012), Local glucocorticoid production in the mouse lung is induced by immune cell stimulation. *Allergy* 67:227–234
83. Huang L, Shanker YG, Dubauskaite J, Zheng JZ, Yan W, Rosenzweig S, Spielman AI, Max M, Margoleske RF (1999), G γ 13 colocalizes with gustducin in taste receptor cells and mediates IP3 responses to bitter denatonium. *Nature neuroscience* 2:1055-1062
84. Iseki S, Kondo H (1990), An immunocytochemical study on the occurrence of liver fatty-acid-binding protein in the digestive organs of rats: specific localization in the D cells and brush cells. *Acta anatomica* 138:15–23
85. Jahnsen FL, Strickland DH, Thomas JA, Tobagus IT, Napoli S, Zosky GR, Turner DJ, Sly PD, Stumbles PA, Holt PG (2006), Accelerated Antigen Sampling and Transport by Airway Mucosal Dendritic Cells following Inhalation of a Bacterial Stimulus¹. *The Journal of Immunology* 177:5861–5867
86. Jault P, Leclerc T, Jennes S, Pirnay JP, Que Y-A, Resch G, Rousseau AF, Ravat F, Carsin H, Le Floch R, Schaal JV, Soler C, Fevre C, Arnaud I, Bretaudeau L, Gabard J (2019), Efficacy and tolerability of a cocktail of bacteriophages to treat burn wounds infected by *Pseudomonas aeruginosa* (PhagoBurn): a randomised, controlled, double-blind phase 1/2 trial. *The Lancet Infectious Diseases* 19:35–45
87. Jeffery PK, Reid L (1975), New observations of rat airway epithelium: a quantitative and electron microscopic study. *Journal of anatomy* 120:295–320
88. Jinno S, Hua X, Yaksh TL (1994), Nicotine and acetylcholine induce release of calcitonin gene-related peptide from rat trachea. *Journal of applied physiology* 76:1651–1656
89. Kaske S, Krasteva G, König P, Kummer W, Hofmann T, Gudermann T, Chubanov V (2007), TRPM5, a taste-signaling transient receptor potential ion-channel, is a ubiquitous signaling component in chemosensory cells. *BMC Neuroscience* 8:o. S.
90. Katz A, Wu D, Simon MI (1992), Subunits $\beta\gamma$ of heterotrimeric G protein activate β 2 isoform of phospholipase C. *Nature* 360:686–689
91. Khalil Z, Helme RD (1989), Sequence of events in substance P-mediated plasma extravasation in rat skin. *Brain Research* 500:256–262
92. Kim JH, Podstawka J, Lou Y, Li L, Lee EKS, Divangahi M, Petri B, Jirik FR, Kelly MM, Yipp BG (2018), Aged polymorphonuclear leukocytes cause fibrotic interstitial lung disease in the absence of regulation by B cells. *Nature immunology* 19:192–201

93. Kirchner T et al. (2018), *Kurzlehrbuch Pathologie*. 13. Auflage. Elsevier, München
94. Kistemaker LEM, Gosens R (2015), Acetylcholine beyond bronchoconstriction: roles in inflammation and remodeling. *Trends in pharmacological sciences* 36:164–171
95. Klapproth H, Reinheimer T, Metzen J, Münch M, Bittinger F, Kirkpatrick CJ, Höhle K-D, Schemann M, Racké K, Wessler I (1997), Non-neuronal acetylcholine, a signalling molecule synthesized by surface cells of rat and man. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of pharmacology* 355:515–523
96. Koeppen M, McNamee EN, Brodsky KS, Aherne CM, Faigle M, Downey GP, Colgan SP, Evans CM, Schwartz DA, Eltzschig HK (2013), Detrimental role of the airway mucin Muc5ac during ventilator-induced lung injury. *Mucosal immunology* 6:762–775
97. Kolaczowska E, Kubes P (2013), Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature reviews. Immunology* 13:159–175
98. Kotrschal K, Whitear M (1988), Chemosensory anterior dorsal fin in rocklings (*Gaidropsarus* and *Ciliata*, teleostei, *Gadidae*): Somatotopic representation of the ramus recurrens facialis a revealed by transganglionic transport of HRP. *The Journal of comparative neurology* 268:109–120
99. Krasteva-Christ G, Soultanova A, Schütz B, Papadakis T, Weiss C, Deckmann K, Chubanov V, Gudermann T, Voigt A, Meyerhof W, Boehm U, Weihe E, Kummer W (2015), Identification of cholinergic chemosensory cells in mouse tracheal and laryngeal glandular ducts. *International immunopharmacology* 29:158–165
100. Krasteva G, Canning BJ, Papadakis T, Kummer W (2012a), Cholinergic brush cells in the trachea mediate respiratory responses to quorum sensing molecules. *Life sciences* 91:992–996
101. Krasteva G, Hartmann P, Papadakis T, Bodenbenner M, Wessels L, Weihe E, Schütz B, Langheinrich AC, Chubanov V, Gudermann T, Ibanez-Tallon I, Kummer W (2012b), Cholinergic chemosensory cells in the auditory tube. *Histochemistry and cell biology* 137:483–497
102. Krasteva G, Canning BJ, Hartmann P, Veres TZ, Papadakis T, Mühlfeld C, Schliecker K, Tallini YN, Braun A, Hackstein H, Baal N, Weihe E, Schütz B, Kotlikoff M, Ibanez-Tallon I, Kummer W (2011), Cholinergic chemosensory cells in the trachea regulate breathing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:9478–9483
103. Kulkarni HS, Liszewski MK, Brody SL, Atkinson JP (2018), The complement system in the airway epithelium: An overlooked host defense mechanism and therapeutic target? *The Journal of allergy and clinical immunology* 141:1582-1586.e1
104. Kummer W, Fischer A, Kurkowski, R., Heym, C. (1992), The sensory and sympathetic innervation of guinea-pig lung and trachea as studied by retrograde neuronal tracing and double-labelling immunocytochemistry. *Neuroscience* 49:715–737
105. Kummer W, Lips KS, Pfeil U (2008), The epithelial cholinergic system of the airways. *Histochemistry and cell biology* 130:219–234
106. Kutateladze M, Adamia R (2010), Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics. *Trends in biotechnology* 28:591–595
107. Kvach MV, Ustinov AV, Stepanova IA, Malakhov AD, Skorobogatyi MV, Shmanai VV, Korshun VA (2008), A Convenient Synthesis of Cyanine Dyes: Reagents for the Labeling of Biomolecules. *European Journal of Organic Chemistry* 2008:2107–2117

108. Lanks CW, Musani AI, Hsia DW (2019), Community-acquired Pneumonia and Hospital-acquired Pneumonia. *The Medical clinics of North America* 103:487–501
109. Lasconi C, Pifferi S, Hernandez-Clavijo A, Merigo F, Cecchini MP, Gonzalez-Velandia KY, Agostinelli E, Sbarbati A, Menini A (2019), Bitter tastants and artificial sweeteners activate a subset of epithelial cells in acute tissue slices of the rat trachea. *Scientific reports* 9:1–15
110. Latorraca NR, Venkatakrishnan AJ, Dror RO (2017), GPCR Dynamics: Structures in Motion. *Chemical reviews* 117:139–155
111. Launay P, Cheng H, Srivatsan S, Penner R, Fleig A, Kinet J-P (2004), TRPM4 regulates calcium oscillations after T cell activation. *Science (New York, N.Y.)* 306:1374–1377
112. Lee GR (2018), The Balance of Th17 versus Treg Cells in Autoimmunity. *International journal of molecular sciences* 19:o.S.
113. Lee RJ, Kofonow JM, Rosen PL, Siebert AP, Chen B, Doghramji L, Xiong G, Adappa ND, Palmer JN, Kennedy DW, Kreindler JL, Margolskee RF, Cohen NA (2014), Bitter and sweet taste receptors regulate human upper respiratory innate immunity. *The Journal of clinical investigation* 124:1393–1405
114. Lemons K, Fu Z, Ogura T, Lin W (2020), TRPM5-expressing Microvillous Cells Regulate Region-specific Cell Proliferation and Apoptosis During Chemical Exposure. *Neuroscience* 434:171–190
115. Levy BD, Clish CB, Schmidt B, Gronert K, Serhan CN (2001), Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. *Nature immunology* 2:612–619
116. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S (2007), Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature reviews. Immunology* 7:678–689
117. Liu S, Lu S, Xu R, Atzberger A, Günther S, Wettschureck N, Offermanns S (2017), Members of Bitter Taste Receptor Cluster Tas2r143/Tas2r135/Tas2r126 Are Expressed in the Epithelium of Murine Airways and Other Non-gustatory Tissues. *Frontiers in physiology* 8:1–17
118. Lloyd CM, Snelgrove RJ (2018), Type 2 immunity: Expanding our view. *Science immunology* 3:eaat1604
119. Logu F de, Nassini R, Materazzi S, Carvalho Gonçalves M, Nosi D, Rossi Degl'Innocenti D, Marone IM, Ferreira J, Li Puma S, Benemei S, Trevisan G, Souza Monteiro de Araújo D, Patacchini R, Bunnett NW, Geppetti P (2017), Schwann cell TRPA1 mediates neuroinflammation that sustains macrophage-dependent neuropathic pain in mice. *Nature communications* 8:1887
120. Lossow K, Hübner S, Roudnitzky N, Slack JP, Pollastro F, Behrens M, Meyerhof W (2016), Comprehensive Analysis of Mouse Bitter Taste Receptors Reveals Different Molecular Receptive Ranges for Orthologous Receptors in Mice and Humans. *The Journal of biological chemistry* 291:15358–15377
121. Luciano L, Reale E, Ruska H (1968), Über eine "chemorezeptive" Sinneszelle in der Trachea der Ratte. *Zeitschrift für Zellforschung* 85:350–375
122. Luciano L, Reale E (1979), A new morphological aspect of the brush cells of the mouse gallbladder epithelium. *Cell and tissue research* 201:37–44

123. Luciano L, Castellucci M, Reale E (1981), The brush cells of the common bile duct of the rat. This section, freeze-fracture and scanning electron microscopy. *Cell and tissue research* 218:403–420
124. Manicone AM, Huizar I, McGuire JK (2009), Matrilysin (Matrix Metalloproteinase-7) regulates anti-inflammatory and antifibrotic pulmonary dendritic cells that express CD103 (alpha(E)beta(7)-integrin). *The American journal of pathology* 175:2319–2331
125. Marchesi VT, Florey HW (1960), Electron micrographic observations on the emigration of leucocytes. *Quarterly journal of experimental physiology and cognate medical sciences* 45:343–348
126. Matsumoto M, Tanaka T, Kaisho T, Sanjo H, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Akira S (1999), A Novel LPS-Inducible C-Type Lectin Is a Transcriptional Target of NF-IL6 in Macrophages. *The Journal of Immunology* 163:5039–5048
127. McDonald DM, Mitchell RA, Gabella G, Haskell A (1988), Neurogenic inflammation in the rat trachea. II. Identity and distribution of nerves mediating the increase in vascular permeability. *Journal of neurocytology* 17:605–628
128. McGovern AE, Davis-Poynter N, Farrell MJ, Mazzone SB (2012), Transneuronal tracing of airways-related sensory circuitry using herpes simplex virus 1, strain H129. *Neuroscience* 207:148–166
129. McGovern AE, Mazzone SB (2014), Neural regulation of inflammation in the airways and lungs. *Autonomic neuroscience : basic & clinical* 182:95–101
130. Merigo F, Benati D, Tizzano M, Osculati F, Sbarbati A (2005), alpha-Gustducin immunoreactivity in the airways. *Cell and tissue research* 319:211–219
131. Meurs H, Dekkers BGJ, Maarsingh H, Halayko AJ, Zaagsma J, Gosens R (2013), Muscarinic receptors on airway mesenchymal cells: novel findings for an ancient target. *Pulmonary pharmacology & therapeutics* 26:145–155
132. Meyerhof W, Batram C, Kuhn C, Brockhoff A, Chudoba E, Bufe B, Appendino G, Behrens M (2010), The molecular receptive ranges of human TAS2R bitter taste receptors. *Chemical senses* 35:157–170
133. Meyrick B, Reid L (1968), The alveolar brush cell in rat lung--a third pneumonocyte. *Journal of ultrastructure research* 23:71–80
134. Michel M-L, Keller AC, Paget C, Fujio M, Trottein F, Savage PB, Wong C-H, Schneider E, Dy M, Leite-de-Moraes MC (2007), Identification of an IL-17-producing NK1.1^{neg} iNKT cell population involved in airway neutrophilia. *The Journal of experimental medicine* 204:995–1001
135. Middelhoff M, Nienhüser H, Valenti G, Maurer HC, Hayakawa Y, Takahashi R, Kim W, Jiang Z, Malagola E, Cuti K, Tailor Y, Zamechek LB, Renz BW, Quante M, Yan KS, Wang TC (2020), Prox1-positive cells monitor and sustain the murine intestinal epithelial cholinergic niche. *Nature communications* 11:1–14
136. Miller C, McMullin B, Ghaffari A, Stenzler A, Pick N, Roscoe D, Ghahary A, Road J, Av-Gay Y (2009), Gaseous nitric oxide bactericidal activity retained during intermittent high-dose short duration exposure. *Nitric oxide : biology and chemistry* 20:16–23
137. Miller MB, Bassler BL (2001), Quorum sensing in bacteria. *Annual Review of Microbiology* 55:165–199

138. Mills CD (2015), Anatomy of a discovery: m1 and m2 macrophages. *Frontiers in immunology* 6:212
139. Moltke J von, O'Leary CE, Barrett NA, Kanaoka Y, Austen KF, Locksley RM (2017), Leukotrienes provide an NFAT-dependent signal that synergizes with IL-33 to activate ILC2s. *The Journal of experimental medicine* 214:27–37
140. Montoro DT, Haber AL, Biton M, Vinarsky V, Lin B, Birket SE, Yuan F, Chen S, Leung HM, Villoria J, Rogel N, Burgin G, Tsankov AM, Waghray A, Slyper M, Waldman J, Nguyen L, Dionne D, Rozenblatt-Rosen O, Tata PR, Mou H, Shivaraju M, Bihler H, Mense M, Tearney GJ, Rowe SM, Engelhardt JF, Regev A, Rajagopal J (2018), A revised airway epithelial hierarchy includes CFTR-expressing ionocytes. *Nature* 560:319–324
141. Morello E, Saussereau E, Maura D, Huerre M, Touqui L, Debarbieux L (2011), Pulmonary bacteriophage therapy on *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis strains: first steps towards treatment and prevention. *PloS one* 6:e16963
142. Müh U, Hare BJ, Duerkop BA, Schuster M, Hanzelka BL, Heim R, Olson ER, Greenberg EP (2006), A structurally unrelated mimic of a *Pseudomonas aeruginosa* acyl-homoserine lactone quorum-sensing signal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:16948–16952
143. Murphy K et Weaver C (2018), *Janeway Immunologie*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg
144. Nelson G, Hoon MA, Chandrashekar J, Zhang Y, Ryba NJP, Zuker CS (2001), Mammalian sweet taste receptors. *Cell* 106:381–390
145. Nelson G, Chandrashekar J, Hoon MA, Feng L, Zhao G, Ryba NJP, Zuker CS (2002), An amino-acid taste receptor. *Nature* 416:199–202
146. Neron M (2017), Deaths: Leading Causes for 2015. *National Vital Statistik Reports* 66
147. Ogura T, Szebenyi SA, Krosnowski K, Sathyanesan A, Jackson J, Lin W (2011), Cholinergic microvillous cells in the mouse main olfactory epithelium and effect of acetylcholine on olfactory sensory neurons and supporting cells. *Journal of neurophysiology* 106:1274–1287
148. Okumura CYM, Nizet V (2014), Subterfuge and sabotage: evasion of host innate defenses by invasive gram-positive bacterial pathogens. *Annual Review of Microbiology* 68:439–458
149. O'Neill LAJ, Golenbock D, Bowie AG (2013), The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nature reviews. Immunology* 13:453–460
150. Ortiz JL, Ortiz A, Milara J, Armengot M, Sanz C, Compañ D, Morcillo E, Cortijo J (2016), Evaluation of Mucociliary Clearance by Three Dimension Micro-CT-SPECT in Guinea Pig: Role of Bitter Taste Agonists. *PloS one* 11:e0164399
151. Perniss A, Liu S, Boonen B, Keshavarz M, Ruppert A-L, Timm T, Pfeil U, Soultanova A, Kusumakshi S, Delventhal L, Aydin Ö, Pyrski M, Deckmann K, Hain T, Schmidt N, Ewers C, Günther A, Lochnit G, Chubanov V, Gudermann T, Oberwinkler J, Klein J, Mikoshiba K, Leinders-Zufall T, Offermanns S, Schütz B, Boehm U, Zufall F, Bufe B, Kummer W (2020), Chemosensory Cell-Derived Acetylcholine Drives Tracheal Mucociliary Clearance in Response to Virulence-Associated Formyl Peptides. *Immunity* 52:683-699.e11

152. Perniss A, Schmidt P, Soultanova A, Papadakis T, Dahlke K, Voigt A, Schütz B, Kummer W, Deckmann K (2021), Development of epithelial cholinergic chemosensory cells of the urethra and trachea of mice. *Cell and tissue research* 385:21–35
153. Petri B, Sanz M-J (2018), Neutrophil chemotaxis. *Cell and tissue research* 371:425–436
154. Phillipson M, Heit B, Colarusso P, Liu L, Ballantyne CM, Kubes P (2006), Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. *The Journal of experimental medicine* 203:2569–2575
155. Phillipson M, Kaur J, Colarusso P, Ballantyne CM, Kubes P (2008), Endothelial Domes Encapsulate Adherent Neutrophils and Minimize Increases in Vascular Permeability in Paracellular and Transcellular Emigration. *PloS one* 3:e1649
156. Pillay J, den Braber I, Vrisekoop N, Kwast LM, Boer RJ de, Borghans JAM, Tesselaar K, Koenderman L (2010), In vivo labeling with 2H₂O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood* 116:625–627
157. Prazak J, Iten M, Cameron DR, Save J, Grandgirard D, Resch G, Goepfert C, Leib SL, Takala J, Jakob SM, Que Y-A, Haenggi M (2019), Bacteriophages Improve Outcomes in Experimental Staphylococcus aureus Ventilator-associated Pneumonia. *American journal of respiratory and critical care medicine* 200:1126–1133
158. Proskocil BJ, Sekhon HS, Jia Y, Savchenko V, Blakely RD, Lindstrom J, Spindel ER (2004), Acetylcholine is an autocrine or paracrine hormone synthesized and secreted by airway bronchial epithelial cells. *Endocrinology* 145:2498–2506
159. Pschyrembel W (2017), *Pschyrembel*. 267. Auflage. De Gruyter, Berlin
160. Pulkkinen V, Manson ML, Säfholm J, Adner M, Dahlén S-E (2012), The bitter taste receptor (TAS2R) agonists denatonium and chloroquine display distinct patterns of relaxation of the guinea pig trachea. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 303:L956-66
161. Rane CK, Jackson SR, Pastore CF, Zhao G, Weiner AI, Patel NN, Herbert DR, Cohen NA, Vaughan AE (2019), Development of solitary chemosensory cells in the distal lung after severe influenza injury. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 316:L1141-L1149
162. Reece JJ, Siracusa MC, Scott AL (2006), Innate immune responses to lung-stage helminth infection induce alternatively activated alveolar macrophages. *Infection and immunity* 74:4970–4981
163. Reinshagen M, Flämig G, Ernst S, Geerling I, Wong H, Walsh JH, Eysselein VE, Adler G (1998), Calcitonin gene-related peptide mediates the protective effect of sensory nerves in a model of colonic injury. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 286:657–661
164. Remijnsen Q, Kuijpers TW, Wirawan E, Lippens S, Vandenabeele P, Vanden Berghe T (2011), Dying for a cause: NETosis, mechanisms behind an antimicrobial cell death modality. *Cell death and differentiation* 18:581–588
165. Rhodin J, Dalhamn T (1956), Electron microscopy of the tracheal ciliated mucosa in rat. *Zeitschrift für Zellforschung* 44:345–412
166. Ricard J-D (2012), New therapies for pneumonia. *Current opinion in pulmonary medicine* 18:181–186

167. Ricklin D, Lambris JD (2013), Complement in immune and inflammatory disorders: pathophysiological mechanisms. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 190:3831–3838
168. Riede U-N et Werner M (2017), *Allgemeine und Spezielle Pathologie*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg
169. Riggs JL, Seiwald RJ, Burckhalter JH, Downs CM, Metcalf TG (1958), Isothiocyanate compounds as fluorescent labeling agents for immune serum. *American Journal of Pathology* 34:1081–1097
170. Robbins SL (2018), *Robbins Basic pathology*. Elsevier, Philadelphia, Pa.
171. Rosenbaum DM, Rasmussen SGF, Kobilka BK (2009), The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* 459:356–363
172. Rossolini GM, Arena F, Pecile P, Pollini S (2014), Update on the antibiotic resistance crisis. *Current opinion in pharmacology* 18:56–60
173. Ruan Z, Haley E, Orozco II, Sabat M, Myers R, Roth R, Du J, Lü W (2021), Structures of the TRPM5 channel elucidate mechanisms of activation and inhibition. *Nature structural & molecular biology* 28:604–613
174. Ryan GB, Majno G (1977), Acute inflammation. *American Journal of Pathology* 86:185–274
175. Sakaguchi T, Okumura R, Ono C, Okuzaki D, Kawai T, Okochi Y, Tanimura N, Murakami M, Kayama H, Umemoto E, Kioka H, Ohtani T, Sakata Y, Miyake K, Okamura Y, Baba Y, Takeda K (2020), TRPM5 Negatively Regulates Calcium-Dependent Responses in Lipopolysaccharide-Stimulated B Lymphocytes. *Cell Reports* 31:107755
176. Samuelsson B (1983), Leukotrienes: Mediators of Immediate Hypersensitivity Reactions and Inflammation. *Science* 220:568–575
177. Saunders CJ, Reynolds SD, Finger TE (2013), Chemosensory brush cells of the trachea. A stable population in a dynamic epithelium. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 49:190–196
178. Saunders CJ, Christensen M, Finger TE, Tizzano M (2014), Cholinergic neurotransmission links solitary chemosensory cells to nasal inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111:6075–6080
179. Sawa T, Yahr TL, Ohara M (1999), Active and passive immunization with the Pseudomonas V antigen protects against type III intoxication and lung injury. *Nature Medicine* 5:392–398
180. Schiebler TH et Korf H-W (2007), *Anatomie*. 10. Auflage. Steinkopff Verlag, Darmstadt
181. Schittny JC (2017), Development of the lung. *Cell and tissue research* 367:427–444
182. Schneider C, O'Leary CE, Locksley RM (2019), Regulation of immune responses by tuft cells. *Nature reviews. Immunology* 19:584–593
183. Seki H, Fukunaga K, Arita M, Arai H, Nakanishi H, Taguchi R, Miyasho T, Takamiya R, Asano K, Ishizaka A, Takeda J, Levy BD (2010), The Anti-Inflammatory and Proresolving Mediator Resolvin E1 Protects Mice from Bacterial Pneumonia and Acute Lung Injury. *The Journal of Immunology* 184:836–843

184. Serhan CN, Chiang N, van Dyke TE (2008), Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nature reviews. Immunology* 8:349–361
185. Shah AS, Ben-Shahar Y, Moninger TO, Kline JN, Welsh MJ (2009), Motile cilia of human airway epithelia are chemosensory. *Science* 325:1131–1134
186. Sheng J, Chen Q, Soncin I, Ng SL, Karjalainen K, Ruedl C (2017), A Discrete Subset of Monocyte-Derived Cells among Typical Conventional Type 2 Dendritic Cells Can Efficiently Cross-Present. *Cell Reports* 21:1203–1214
187. Solleti SK, Srisuma S, Bhattacharya S, Rangel-Moreno J, Bijli KM, Randall TD, Rahman A, Mariani TJ (2016), Serpine2 deficiency results in lung lymphocyte accumulation and bronchus-associated lymphoid tissue formation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 30:2615–2626
188. Song P, Sehkon HS, Jia Y, Keller JA, Blusztajn JK, Mark, Gregory P.: Spindel, Eliot R. (2003), Acetylcholine is synthesized by and acts as an autocrine growth factor for small cell lung carcinoma. *Cancer Research* 63:214–221
189. Spielman AI, Huque T, Nagai H, Whitney G, Brand JG (1994), Generation of Inositol Phosphates in Bitter Taste Transduction. *Physiology and behavior* 56:1149–1155
190. Steinman RM (2006), Linking innate to adaptive immunity through dendritic cells. *Novartis Foundation symposium* 279:101-9; discussion 109-13, 216-9
191. Summers C, Rankin SM, Condliffe AM, Singh N, Peters AM, Chilvers ER (2010), Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol.* 31:318–324
192. Suzuki H, Lasbury ME, Fan L, Vittal R, Mickler EA, Benson HL, Shilling R, Wu Q, Weber DJ, Wagner SR, Lasaro M, Devore D, Wang Y, Sandusky GE, Lipking K, Pandya P, Reynolds J, Love R, Wozniak T, Gu H, Brown KM, Wilkes DS (2013), Role of Complement Activation in Obliterative Bronchiolitis Post–Lung Transplantation. *The Journal of Immunology* 191:4431–4439
193. Swiecki M, Colonna M (2015), The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells. *Nature reviews. Immunology* 15:471–485
194. Tizzano M, Gulbransen BD, Vandenbeuch A, Clapp TR, Herman JP, Sibhatu HM, Churchill MEA, Silver WL, Kinnamon SC, Finger TE (2010), Nasal chemosensory cells use bitter taste signaling to detect irritants and bacterial signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:3210–3215
195. Trepel M et Dalkowski K (2017), *Neuroanatomie. 7. Auflage.* Urban & Fischer Verlag GmbH & Co. KG, Philadelphia
196. Treuting PM et al. (2018), *Comparative anatomy and histology.* Academic Press, London, San Diego, Calif.
197. Trier JS, Allan CH, Marcial MA, Madara JL (1987), Structural features of the apical and tubulovesicular membranes of rodent small intestinal tuft cells. *The anatomical record* 219:69–77
198. Ualiyeva S, Yoshimoto E, Barrett NA, Bankova LG (2019), Isolation and Quantitative Evaluation of Brush Cells from Mouse Tracheas. *Journal of visualized experiments : JoVE* 148
199. Ualiyeva S, Hallen N, Kanaoka Y, Ledderose C, Matsumoto I, Junger WG, Barrett NA, Bankova LG (2020), Airway brush cells generate cysteinyl leukotrienes through the ATP sensor P2Y2. *Science immunology* 5:eaax7224

200. Vacca G, Randerath WJ, Gillissen A (2011), Inhibition of granulocyte migration by tiotropium bromide. *Respiratory research* 12:o. S.
201. Veres TZ, Zoltán Veres T, Voedisch S, Spies E, Tschernig T, Braun A (2011), Spatiotemporal and functional behavior of airway dendritic cells visualized by two-photon microscopy. *The American journal of pathology* 179:603–609
202. Voedisch S, Rochlitzer S, Veres TZ, Spies E, Braun A (2012), Neuropeptides control the dynamic behavior of airway mucosal dendritic cells. *PLoS one* 7:e45951
203. Wang J, Hossain M, Thanabalasuriar A, Gunzer M, Meininger C, Kubes P (2017), Visualizing the function and fate of neutrophils in sterile injury and repair. *Science (New York, N.Y.)* 358:111–116
204. Wang S, Voisin M-B, Larbi KY, Dangerfield J, Scheiermann C, Tran M, Maxwell PH, Sorokin L, Nourshargh S (2006), Venular basement membranes contain specific matrix protein low expression regions that act as exit points for emigrating neutrophils. *The Journal of experimental medicine* 203:1519–1532
205. Welte T, Torres A, Nathwani D (2012), Clinical and economic burden of community-acquired pneumonia among adults in Europe. *Thorax* 67:71–79
206. Wen X, Zhou J, Zhang D, Li J, Wang Q, Feng N, Zhu H, Song Y, Li H, Bai C (2015), Denatonium inhibits growth and induces apoptosis of airway epithelial cells through mitochondrial signaling pathways. *Respiratory research* 16:13
207. Weyrauch KD, Schnorr B (1976), Die Feinstruktur des Epithels des Ductus pancreaticus major des Schafes. *Acta anatomica* 96:232–247
208. Wiederhold S, Papadakis T, Chubanov V, Gudermann T, Krasteva-Christ G, Kummer W (2015), A novel cholinergic epithelial cell with chemosensory traits in the murine conjunctiva. *International immunopharmacology* 29:45–50
209. Wienhold S-M, Lienau J, Witzentrath M (2019), Towards Inhaled Phage Therapy in Western Europe. *Viruses* 11
210. Wiesenfeld-Hallin Z, Hökfelt T, Lundberg JM, Forssmann WG, Reinecke M, Tschopp FA, Fischer JA (1984), Immunoreactive calcitonin gene-related peptide and substance P coexist in sensory neurons to the spinal cord and interact in spinal behavioral responses of the rat. *Neuroscience Letters* 52:199–204
211. Williams MR, Azcutia V, Newton G, Alcaide P, Luscinskas FW (2011), Neutrophils cascading their way to inflammation. *Trends in immunology* 32:o.S.
212. Wilson W. (1990), DNA sequence dependent binding modes of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). *Biochemistry* 29:8452–8461
213. Wong GT, Gannon KS, Margolskee RF (1996), Transduction of bitter and sweet taste by gustducin. *Nature* 381:796–800
214. Wu SV, Chen MC, Rozengurt E (2005), Genomic organization, expression, and function of bitter taste receptors (T2R) in mouse and rat. *Physiological genomics* 22:139–149
215. Yamaguchi T, Yamashita J, Ohmoto M, Aoudé I, Ogura T, Luo W, Bachmanov, Alexander A., Lin W, Matsumoto I, Hirota J (2014), *Skn-1a/Pou2f3* is required for the generation of *Trpm5*-

expressing microvillous cells in the mouse main olfactory epithelium. *BMC Neuroscience* 15:1471–2202

216. Yamasaki S, Ishikawa E, Sakuma M, Hara H, Ogata K, Saito T (2008), Mincle is an ITAM-coupled activating receptor that senses damaged cells. *Nature immunology* 9:1179–1188

217. Yamashita J, Ohmoto M, Yamaguchi T, Matsumoto I, Hirota J (2017), *Skn-1a/Pou2f3* functions as a master regulator to generate *Trpm5*-expressing chemosensory cells in mice. *PloS one* 12:e0189340

218. Yamashita S (2007), Heat-induced antigen retrieval: mechanisms and application to histochemistry. *Progress in histochemistry and cytochemistry* 41:141–200

219. Yates EA, Philipp B, Buckley C, Atkinson S, Chhabra SR, Sockett RE, Goldner M, Dessaux Y, Cámara M, Smith H, Williams P (2002), N-acylhomoserine lactones undergo lactonolysis in a pH-, temperature-, and acyl chain length-dependent manner during growth of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and immunity* 70:5635–5646

220. Zhang Z, Zhao Z, Margolske R, Liman E (2007), The Transduction Channel TRPM5 Is Gated by Intracellular Calcium in Taste Cells. *The Journal of Neuroscience* 27:5777–5786

221. Zhao, M.D., Natalia Goldstein, Haibin Yang, Andrew T. Cowan, Ph.D., Bei Chen, Chunquan Zheng, James N. Palmer, James L. Kreindler, and Noam A. Cohen (2011), Inherent Differences in Nasal and Tracheal Ciliary Function in Response to *Pseudomonas aeruginosa* Challenge. *American Journal of Rhinology & Allergy* 25:209–213

222. Zlotnik A, Yoshie O (2012), The chemokine superfamily revisited. *Immunity* 36:705–716

Internetquellen

223. Pulce C et al., Denatonium Benzoate - an overview. URL: <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/denatonium-benzoate> [Stand 14.04.2020]

224. U.S. National Library of Medicine, Denatonium benzoate. URL: <https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/rn/3734-33-6> [Stand 14.04.2020]

225. WHO, The top 10 causes of death. URL: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death> [Stand 15.08.2020]

Abkürzungsverzeichnis

3-Oxo-HSL	<i>3-Oxododecanoyl-homoserin Lacton</i>
Abb.	<i>Abbildung</i>
ACh	<i>Acetylcholin</i>
AHL	<i>acylhomoserin Lactone</i>
APC	<i>antigen-präsentierende Zellen</i>
ATP	<i>Adenosintriphosphat</i>
BC	<i>Bürstenzelle</i>
bidest.	<i>zweifach destilliert</i>
cAMP	<i>cyklisches Adenosinmonophosphat</i>
CAP	<i>community-acquired pneumonia</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CGRP	<i>Calcitonin Gene-Related Peptide</i>
ChAT	<i>Cholin-Acetyl-Transferase</i>
DAG	<i>Diacylglycerol</i>
DAMP	<i>dammage-associated molecular pattern</i>
DAPI	<i>4',6-Diamin-2-phenylindol</i>
DC	<i>dendritische Zellen</i>
DCAMKL1	<i>Doublecortin like kinase 1</i>
DRG	<i>Dorsal root ganglia</i>
EDTA	<i>Ethylendiamintetraessigsäure</i>
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EZ	<i>extrazellulär</i>
Fc	<i>fragment crystallizable region</i>
FITC	<i>Fluoresceinisothiocyanat</i>
GDP	<i>Guanosindiphosphat</i>
GPCR	<i>G-Protein gekoppelter Rezeptor</i>
GTP	<i>Guanosintriphosphat</i>
HAP	<i>hospital-acquired pneumonia</i>
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>
Ig	<i>Immunglobulin</i>
IHC	<i>Immunhistochemie</i>
IL	<i>Interleukin</i>
ILC	<i>innate lymphoid cells</i>
IP ₃	<i>Inositol-1,4,5-trisphosphat</i>
IP ₃ R3	<i>IP3-Rezeptor</i>
KO	<i>Knock-out</i>
LFA	<i>Lymphocyte function-associated antigen</i>
LPS	<i>Lipopolysaccharide</i>
LT	<i>Leukotrien</i>
LX	<i>Lipoxin</i>
Ly6G	<i>Lymphocyte antigen 6 complex locus G6D</i>
M2R	<i>M2-Rezeptor</i>
M3R	<i>M3-Rezeptor</i>
Mac	<i>Makrophagenantigen</i>
mAChR	<i>muskarinischer Acetylcholinrezeptor</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein Kinase</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
nAChR	<i>nikotinischer Acetylcholinrezeptor</i>
NaCl	<i>Natriumchlorid</i>
NK	<i>Neurokinin</i>

NO	<i>Stickstoffmonoxid</i>
NOD	<i>Nukleotid-bindende Oligomerisationsdomäne</i>
OE	<i>Organentnahme</i>
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PBS	<i>Phosphate buffer saline, Phosphate buffer saline</i>
PDE	<i>Phosphodiesterase</i>
PFA	<i>Paraformaldehyd</i>
PG	<i>Prostaglandin</i>
PIP ₂	<i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat</i>
PKA	<i>Proteinkinase A</i>
PKC	<i>Proteinkinase C</i>
PLC	<i>Phospholipase C</i>
PP	<i>Phosphatpuffer</i>
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
PVP	<i>Polyvinylpyrrolidon</i>
QSM	<i>quorum-sensing Moleküle</i>
Rac2	<i>kleines Signal-G-Protein</i>
ROS	<i>reaktive Sauerstoffspezies, reaktive Sauerstoffspezies</i>
SCC	<i>solitary chemosensory cell</i>
SOCS3	<i>Suppressor of cytokine signaling 3</i>
Tab.	<i>Tabelle</i>
Tas1R	<i>Süß-/Umamirezeptor</i>
Tas2R	<i>Bitterrezeptor</i>
TLR	<i>Toll-like Rezeptoren</i>
TNF	<i>Tumornekrosefaktor</i>
TRPM5	<i>transient receptor potential cation channel subfamily M member 5</i>
VAChT	<i>vesikulärer Acetylcholin Transporter</i>

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Geschmackstransduktionskaskade der Bürstenzelle	16
Abbildung 1.2: Strukturformel von Denatonium benzoate	27
Abbildung 2.1: Durchführung der Operation und Inhalation	37
Abbildung 2.2: Schnittreihe der Lunge	43
Abbildung 2.3: Darstellung von gezählten/nicht-gezählten Zellen in der Lunge (Ly6G, Bsp.)	44
Abbildung 3.1: Übersicht der relevanten Strukturen am Trachea-Schnitt	46
Abbildung 3.2: Immunhistochemie der Tracheen aller Versuchsgruppen, DCAMKL1 und DAPI	46
Abbildung 3.3: Immunhistochemie der Trachea, TRPM5-794-Antikörper (V. Flockerzi)	47
Abbildung 3.4: Einzelwerte der DCAMKL1-positiven Zellen pro Trachearing, alle Gruppen.....	48
Abbildung 3.5: Keine Auswirkung der Vehikelinhalation auf die Bürstenzellzahl (Trachea)	48
Abbildung 3.6: Zeitlicher Verlauf der Bürstenzellzahl beider Mausstämmen	49
Abbildung 3.7: Immunhistochemie der Tracheen aller Versuchsgruppen, Ly6G und DAPI	50
Abbildung 3.8: Einzelwerte der neutrophilen Granulozyten pro Trachearing, alle Gruppen	51
Abbildung 3.9: Keine Auswirkung der Vehikelinhalation auf die Neutrophilenzahl (Trachea).....	51
Abbildung 3.10: Zeitlicher Verlauf der Neutrophilenzahl beider Mausstämmen (Trachea)	52
Abbildung 3.11: Immunhistochemie der Tracheen aller Versuchsgruppen, CD11c und DAPI	54
Abbildung 3.12: Einzelwerte der dendritischen Zellen pro Trachearing, alle Gruppen.....	55
Abbildung 3.13: keine Auswirkung der Vehikelinhalation auf die dendritischen Zellen (Trachea)	56
Abbildung 3.14: Zeitlicher Verlauf der Zahl dendritischer Zellen beider Mausstämmen	56
Abbildung 3.15: Positivkontrolle CD45R-Antikörper, perihilärer Lymphknoten	57
Abbildung 3.16: Immunhistochemie der Tracheen aller Versuchsgruppen, CD45R und DAPI.....	58
Abbildung 3.17: Immunhistochemie der Lunge, Chargenvergleich F4/80-Antikörper	58
Abbildung 3.18: Immunhistochemie der Trachea, C3-Antikörper (Komplement)	59
Abbildung 3.19: Quantifizierung der C3-Aktivität in der Trachea (Komplement).....	59
Abbildung 3.20: Streudiagramm Neutrophile und Bürstenzellen	60
Abbildung 3.21: Streudiagramm dendritische Zellen und Bürstenzellen	61
Abbildung 3.22: Streudiagramm dendritische Zellen und Bürstenzellen, lineare Regression.....	61
Abbildung 3.23: Immunhistochemie der Lungen aller Versuchsgruppen, Ly6G	63
Abbildung 3.24: Einzelwerte der Neutrophilen in der Lunge, alle Gruppen	64
Abbildung 3.25: Auswirkung der Vehikelinhalation auf die Zahl der Neutrophilen in der Lunge..	65
Abbildung 3.26: Zeitlicher Verlauf der Neutrophilenzahl beider Mausstämmen (Lunge)	65
Abbildung 3.27: Immunhistochemie der Lunge, Ly6G-positive Granula	67
Abbildung 3.28: Immunhistochemie der Lunge, Hauptbronchien	68
Abbildung 3.29: Immunhistochemie der Lungen aller Versuchsgruppen, CD45R	69
Abbildung 3.30: Einzelwerte der B-Lymphozyten in der Lunge, alle Gruppen	70
Abbildung 3.31: Auswirkung der Vehikelinhalation auf die B-Lymphozyten in der Lunge.....	71
Abbildung 3.32: Zeitlicher Verlauf der B-Lymphozytenzahl beider Mausstämmen (Lunge)	71
Abbildung 3.33: Immunhistochemie der Lungen aller Versuchsgruppen, CD3	73
Abbildung 3.34: Auswirkung der Vehikelinhalation auf die T-Lymphozyten in der Lunge	74
Abbildung 3.35: Einzelwerte der T-Lymphozyten in der Lunge, alle Gruppen.....	75
Abbildung 3.36: Zeitlicher Verlauf der T-Lymphozytenzahl beider Mausstämmen (Lunge)	76
Abbildung 3.37: Immunhistochemie der Lunge mit Lectin-FITC-Antikörper und DAPI	77
Abbildung 3.38: Immunhistochemie der Lunge mit F4/80-Antikörpern, DAPI.....	78
Abbildung 3.39: Immunhistochemie der Lunge mit F4/80- und Lyve-1-Antikörpern, DAPI	78

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Bürstenzellmarker und ihre Erstbeschreibung als solche.....	17
Tabelle 1.2: Wirkungen von Denatonium in den Atemwegen.....	27
Tabelle 2.1: Verwendete Chemikalien und Reagenzien.....	29
Tabelle 2.2: Primäre Antikörper, Konzentrationen, Vorbehandlung und Bezugsquellen.....	31
Tabelle 2.3a: Sekundäre Antikörper, Konzentrationen und Bezugsquellen.....	32
Tabelle 2.3b: Spektrale Eigenschaften der Fluorochrome.....	33
Tabelle 2.4: Verwendeter Laborbedarf und Bezugsquellen.....	33
Tabelle 2.5: Genutzte Geräte und Hersteller.....	34
Tabelle 2.6: Veterinärmedizinischer Bedarf und Hersteller.....	35
Tabelle 2.7: Untersuchten Merkmale bei der Korrelationsanalyse.....	44
Tabelle 2.8: Gruppenverteilung der Versuchstiere.....	45
Tabelle 10.1: Deskriptive Statistik der Zählung der Bürstenzellen in der Trachea.....	115
Tabelle 10.2: Deskriptive Statistik der Zählung der Neutrophilen in der Trachea.....	115
Tabelle 10.3: Deskriptive Statistik der Zählung der dendritischen Zellen in der Trachea.....	116
Tabelle 10.4: Deskriptive Statistik der Zählung der Neutrophilen in der Lunge.....	116
Tabelle 10.5: Deskriptive Statistik der Zählung der B-Lymphozyten in der Lunge.....	117
Tabelle 10.6: Deskriptive Statistik der Zählung der T-Lymphozyten in der Lunge.....	117

Anhang

Descriptive statistics		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
		WT OE	KO OE	WT 1d PBS	KO 1d PBS	WT 1d den.	KO 1d den.	WT 3d den.	KO 3d den.	WT 7d den.	KO 7d den.
1	Number of values	15	15	15	13	20	20	20	15	18	19
2											
3	Minimum	6.000	2.000	1.000	2.000	3.000	1.000	4.000	2.000	2.000	2.000
4	25% Percentile	7.000	4.000	3.000	4.000	5.000	4.000	7.000	3.000	4.000	5.000
5	Median	10.00	5.000	5.000	5.000	7.500	7.000	9.500	6.000	6.500	7.000
6	75% Percentile	13.00	6.000	7.000	7.500	11.75	8.750	12.75	10.00	13.25	9.000
7	Maximum	18.00	11.00	11.00	10.00	17.00	13.00	19.00	13.00	20.00	15.00
8	Range	12.00	9.000	10.00	8.000	14.00	12.00	15.00	11.00	18.00	13.00
9											
10	95% CI of median										
11	Actual confidence leve	96.48%	96.48%	96.48%	97.75%	95.86%	95.86%	95.86%	96.48%	96.91%	98.08%
12	Lower confidence limit	7.000	4.000	3.000	4.000	5.000	4.000	7.000	3.000	4.000	5.000
13	Upper confidence limit	13.00	6.000	7.000	8.000	11.00	8.000	12.00	10.00	13.00	9.000
14											
15	Mean	10.60	5.600	5.400	5.692	8.300	6.550	10.20	6.267	8.778	7.158
16	Std. Deviation	3.680	2.131	3.043	2.496	4.028	3.252	4.213	3.751	5.309	3.548
17	Std. Error of Mean	0.9502	0.5503	0.7856	0.6923	0.9006	0.7272	0.9420	0.9684	1.251	0.8139
18											
19	Lower 95% CI of mean	8.562	4.420	3.715	4.184	6.415	5.028	8.228	4.190	6.138	5.448
20	Upper 95% CI of mean	12.64	6.780	7.085	7.201	10.18	8.072	12.17	8.344	11.42	8.868
21											
22	Coefficient of variation	34.72%	38.06%	56.34%	43.85%	48.52%	49.65%	41.30%	59.85%	60.48%	49.56%

Tabelle 10.1: deskriptive Statistik der Zählung der Bürstenzellen in der Trachea

Descriptive statistics		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
		WT OE	KO OE	WT 1d PBS	KO 1d PBS	WT 1d den.	KO 1d den.	WT 3d den.	KO 3d den.	WT 7d den.	KO 7d den.
1	Number of values	15	15	14	11	24	26	20	20	15	12
2											
3	Minimum	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	2.000	7.000
4	25% Percentile	0.000	0.000	0.000	2.000	1.000	11.75	0.000	1.250	5.000	15.50
5	Median	1.000	1.000	4.500	5.000	7.000	21.50	1.000	3.500	10.00	23.50
6	75% Percentile	2.000	2.000	11.25	7.000	20.75	33.25	3.750	4.000	18.00	36.25
7	Maximum	3.000	4.000	21.00	14.00	143.0	120.0	8.000	11.00	36.00	55.00
8	Range	3.000	4.000	21.00	13.00	143.0	120.0	8.000	11.00	34.00	48.00
9											
10	95% CI of median										
11	Actual confidence leve	96.48%	96.48%	98.71%	98.83%	97.73%	97.10%	95.86%	95.86%	96.48%	96.14%
12	Lower confidence limit	0.000	0.000	0.000	2.000	1.000	14.00	0.000	2.000	5.000	15.00
13	Upper confidence limit	2.000	2.000	15.00	7.000	20.00	31.00	3.000	4.000	18.00	38.00
14											
15	Mean	1.067	1.333	6.357	5.091	23.63	28.88	2.200	3.550	13.07	26.08
16	Std. Deviation	0.8837	1.175	7.012	3.590	38.74	30.48	2.628	2.564	10.24	14.30
17	Std. Error of Mean	0.2282	0.3034	1.874	1.083	7.908	5.978	0.5876	0.5734	2.643	4.128
18											
19	Lower 95% CI of mean	0.5773	0.6826	2.308	2.679	7.267	16.57	0.9702	2.350	7.398	17.00
20	Upper 95% CI of mean	1.556	1.984	10.41	7.503	39.98	41.20	3.430	4.750	18.74	35.17
21											
22	Coefficient of variation	82.85%	88.14%	110.3%	70.53%	164.0%	105.5%	119.4%	72.24%	78.34%	54.82%

Tabelle 10.2: deskriptive Statistik der Zählung der neutrophilen Granulozyten in der Trachea

Descriptive statistics		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
		WT OE	KO OE	WT 1d PBS	KO 1d PBS	WT 1d den.	KO 1d den.	WT 3d den.	KO 3d den.	WT 7d den.	KO 7d den.
1	Number of values	15	15	15	14	20	23	19	18	18	20
2											
3	Minimum	3.000	1.000	1.000	4.000	1.000	1.000	1.000	5.000	1.000	1.000
4	25% Percentile	7.000	3.000	7.000	10.00	13.00	6.000	15.00	17.00	13.50	7.250
5	Median	14.00	7.000	10.00	13.50	18.50	11.00	24.00	23.00	18.00	14.50
6	75% Percentile	15.00	14.00	16.00	17.00	26.00	20.00	39.00	32.75	26.25	21.75
7	Maximum	26.00	21.00	27.00	28.00	43.00	34.00	63.00	77.00	48.00	40.00
8	Range	23.00	20.00	26.00	24.00	42.00	33.00	62.00	72.00	47.00	39.00
9											
10	95% CI of median										
11	Actual confidence level	96.48%	96.48%	96.48%	98.71%	95.86%	96.53%	98.08%	96.91%	96.91%	95.86%
12	Lower confidence limit	7.000	3.000	7.000	10.00	16.00	7.000	15.00	17.00	14.00	8.000
13	Upper confidence limit	15.00	14.00	16.00	20.00	23.00	17.00	39.00	31.00	26.00	21.00
14											
15	Mean	13.07	9.067	11.40	14.14	19.80	13.04	26.89	27.50	20.11	15.70
16	Std. Deviation	6.756	6.170	7.149	6.538	10.97	8.937	16.20	18.45	10.79	9.836
17	Std. Error of Mean	1.744	1.593	1.846	1.747	2.452	1.863	3.717	4.348	2.542	2.199
18											
19	Lower 95% CI of mean	9.326	5.650	7.441	10.37	14.67	9.179	19.09	18.33	14.75	11.10
20	Upper 95% CI of mean	16.81	12.48	15.36	17.92	24.93	16.91	34.70	36.67	25.47	20.30
21											
22	Coefficient of variation	51.70%	68.05%	62.71%	46.23%	55.39%	68.51%	60.25%	67.08%	53.63%	62.65%

Tabelle 10.3: deskriptive Statistik der Zählung der dendritischen Zellen in der Trachea

Descriptive statistics		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
		WT OE	KO OE	WT 1d PBS	KO 1d PBS	WT 1d den.	KO 1d den.	WT 3d den.	KO 3d den.	WT 7d den.	KO 7d den.
1	Number of values	160	120	120	120	160	160	70	160	160	140
2											
3	Minimum	2.000	3.000	4.000	0.000	4.000	5.000	3.000	0.000	3.000	2.000
4	25% Percentile	7.000	10.25	12.00	15.00	13.00	18.00	11.75	12.00	16.00	12.25
5	Median	11.00	14.00	17.00	21.00	19.00	31.50	16.00	17.00	21.50	16.50
6	75% Percentile	16.00	16.00	22.00	28.00	27.00	47.00	20.25	27.50	26.75	21.00
7	Maximum	27.00	33.00	33.00	48.00	46.00	95.00	35.00	56.00	42.00	43.00
8	Range	25.00	30.00	29.00	48.00	42.00	90.00	32.00	56.00	39.00	41.00
9											
10	95% CI of median										
11	Actual confidence level	95.22%	96.47%	96.47%	96.47%	95.22%	95.22%	95.86%	95.22%	95.22%	96.58%
12	Lower confidence limit	10.00	13.00	15.00	19.00	17.00	28.00	14.00	15.00	20.00	16.00
13	Upper confidence limit	13.00	15.00	18.00	23.00	22.00	37.00	18.00	19.00	23.00	18.00
14											
15	Mean	12.05	13.50	17.43	21.78	20.61	34.90	16.60	20.44	21.69	17.55
16	Std. Deviation	5.409	4.746	7.243	9.301	9.536	19.73	6.874	12.41	7.683	7.626
17	Std. Error of Mean	0.4276	0.4332	0.6612	0.8491	0.7539	1.560	0.8217	0.9814	0.6074	0.6446
18											
19	Lower 95% CI of mean	11.21	12.64	16.12	20.10	19.12	31.82	14.96	18.51	20.49	16.28
20	Upper 95% CI of mean	12.89	14.36	18.74	23.46	22.10	37.98	18.24	22.38	22.89	18.82
21											
22	Coefficient of variation	44.89%	35.15%	41.55%	42.70%	46.28%	56.54%	41.41%	60.72%	35.42%	43.46%

Tabelle 10.4: deskriptive Statistik der Zählung der neutrophilen Granulozyten in der Lunge

Descriptive statistics		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
		WT OE	KO OE	WT 1d PBS	KO 1d PBS	WT 1d den.	KO 1d den.	WT 3d den.	KO 3d den.	WT 7d den.	KO 7d den.
1	Number of values	160	120	120	80	160	160	140	120	130	150
2											
3	Minimum	12.00	6.000	9.000	25.00	17.00	12.00	11.00	16.00	19.00	17.00
4	25% Percentile	23.00	14.25	33.00	36.00	32.25	32.00	23.25	37.00	35.00	32.00
5	Median	33.00	18.00	47.50	44.00	38.50	48.00	32.00	45.50	48.00	41.00
6	75% Percentile	49.00	26.00	59.75	55.00	53.00	65.00	48.75	59.75	67.00	47.25
7	Maximum	97.00	53.00	94.00	76.00	109.0	105.0	87.00	123.0	110.0	82.00
8	Range	85.00	47.00	85.00	51.00	92.00	93.00	76.00	107.0	91.00	65.00
9											
10	95% CI of median										
11	Actual confidence level	95.22%	96.47%	96.47%	96.70%	95.22%	95.22%	96.58%	96.47%	95.67%	95.91%
12	Lower confidence limit	29.00	17.00	39.00	40.00	37.00	45.00	29.00	42.00	42.00	38.00
13	Upper confidence limit	37.00	22.00	52.00	48.00	41.00	52.00	40.00	52.00	55.00	43.00
14											
15	Mean	37.61	20.48	47.98	45.33	44.86	50.85	37.17	49.66	52.66	41.03
16	Std. Deviation	18.52	9.088	19.17	11.48	19.04	21.99	16.60	18.79	21.42	12.44
17	Std. Error of Mean	1.464	0.8296	1.750	1.283	1.505	1.739	1.403	1.716	1.879	1.016
18											
19	Lower 95% CI of mean	34.71	18.83	44.51	42.77	41.88	47.42	34.40	46.26	48.94	39.02
20	Upper 95% CI of mean	40.50	22.12	51.44	47.88	47.83	54.28	39.95	53.06	56.38	43.03
21											
22	Coefficient of variation	49.24%	44.38%	39.97%	25.32%	42.45%	43.25%	44.66%	37.85%	40.67%	30.32%

Tabelle 10.5: deskriptive Statistik der Zählung der B-Lymphozyten in der Lunge

Descriptive statistics		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
		Kontrolle WT	Kontrolle KO	PBS WT	PBS KO	WT 1d den.	KO 1d den.	WT 3d den.	KO 3d den.	WT 7d den.	KO 7d den.
1	Number of values	48	36	36	36	45	48	42	45	48	45
2											
3	Minimum	11.00	7.000	12.00	9.000	10.00	11.00	7.000	12.00	11.00	19.00
4	25% Percentile	18.50	15.00	21.00	17.00	16.00	19.00	10.00	17.50	15.00	26.50
5	Median	25.00	18.00	26.00	25.00	22.00	23.00	13.00	23.00	17.50	35.00
6	75% Percentile	28.00	23.25	32.00	30.50	30.50	27.00	18.00	32.00	22.00	45.00
7	Maximum	38.00	32.00	40.00	42.00	47.00	35.00	36.00	49.00	30.00	77.00
8	Range	27.00	25.00	28.00	33.00	37.00	24.00	29.00	37.00	19.00	58.00
9											
10	Mean	24.23	18.72	26.78	24.28	24.31	22.67	14.69	24.64	18.92	37.49
11	Std. Deviation	6.566	5.795	7.341	8.508	9.219	5.987	6.299	8.526	5.123	13.56
12	Std. Error of Mean	0.9478	0.9658	1.224	1.418	1.374	0.8641	0.9720	1.271	0.7395	2.022
13											
14	Lower 95% CI of mean	22.32	16.76	24.29	21.40	21.54	20.93	12.73	22.08	17.43	33.41
15	Upper 95% CI of mean	26.14	20.68	29.26	27.16	27.08	24.41	16.65	27.21	20.40	41.56

Tabelle 10.6: deskriptive Statistik der Zählung der T-Lymphozyten in der Lunge

Danksagung

Für die Unterstützung und reichliche wohlwollende Hilfe, welche ich bei der Erstellung dieser Arbeit von vielen Seiten erhalten habe, möchte ich mich von ganzem Herzen bedanken.

Zunächst danke ich Frau Professor Gabriela Krasteva-Christ für die Überlassung des Themas, die immer wohlwollende, hilfreiche, technische und fachliche Unterstützung. Das gute Verhältnis hat die Arbeit immer erfreulich gestaltet, wofür ich sehr dankbar bin. Ich wurde nie unter Druck gesetzt, sondern immer motiviert, gefördert und gefordert, was für mich zu einem guten Gelingen der Arbeit beigetragen hat.

Mein herzlicher Dank gilt allen Mitarbeitern der eigenen Arbeitsgruppe im Institut für Anatomie, Zellbiologie und Entwicklungsbiologie der Universität des Saarlandes. Besonders bedanke ich mich bei Herrn Dr. Stephan Maxeiner für die zahlreichen sehr bereichernden Gespräche, welche mich immer wieder zum kreativen Nachdenken angeregt haben. Ebenfalls möchte ich Frau Alaa Salah für die immer währende intensive emotionale und fachlich-praktische Unterstützung danken, welche mir sehr geholfen hat.

Für die technische Unterstützung und anfängliche Hilfe danke ich insbesondere Frau Nora Aouragh und Frau Andrea Rabung, ohne welche ich sicherlich viele Mühen in der praktischen Laborarbeit gehabt hätte.

Herzlich danken möchte ich auch der Arbeitsgruppe von Professor Dinh aus dem Institut für Pulmologie an der Universitätsklinik des Saarlandes, welche es mir freundlicherweise ermöglichte trotz unseres Defekten Kryostaten Gewebeschnitte anzufertigen. Für die Möglichkeit der Nutzung des AxioScan möchte ich mich bei Herrn Philipp Wartenberg und Frau Ramona Grünewald aus dem Institut für experimentelle Pharmakologie sowie bei Frau Dr. Anja Scheller aus dem Institut für Physiologie herzlichst bedanken.

Der nächste Dank mag etwas unkonventionell sein, bedeutet mir aber viel. Ich danke der herausragenden Ärztin Frau Dr. Andrea Fenk-Mayer für die vielen sehr wichtigen und lehrreichen Erfahrungen in der ärztlichen Praxis, welche ich dank ihr in den letzten Jahren habe sammeln dürfen. Das Wissen und die Lebenseinstellung, welche ich dadurch erlangt habe, haben mir auch im Laufe dieser Arbeit sehr geholfen.

Ein besonderer Dank gilt meinen Freunden, welche meine dauernde Abwesenheit während des Forschungssemesters toleriert haben.

Ein ganz lieber Dank geht an meine Familie für die andauernde Liebe und Unterstützung. Hierbei besonderen Dank an meinen Vater, welcher unermüdlich meine Arbeit korrekturgelesen hat und mir auch immer wieder fachliche Denkanstöße gegeben hat.

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.