

**Charakterisierung zellulärer Quellen einer
non-quantalen Acetylcholinfreisetzung
in den Atemwegen von Mäusen**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Lucas Delventhal
aus Henstedt-Ulzburg

Gießen 2022

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Institut für Anatomie und Zellbiologie
Arbeitsgruppe Viszerale Neurobiologie

1. Gutachter: Prof. Dr. W. Kummer

2. Gutachter: Prof. Dr. M. Hecker, PhD

Tag der Disputation: 19.09.2022

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Allgemeine Anatomie der Atemwege	1
1.2	Innervation der Atemwege	3
1.2.1	Sensorische Neurone des N. vagus	4
1.3	Das neuronale und nicht-neuronale cholinerge System	6
1.4	ACh-Synthese und cholinerge Rezeptoren	7
1.4.1	Cholin-Transporter	7
1.4.2	ACh-Synthese	8
1.4.3	Cholinerge Rezeptoren	10
1.4.4	ACh-Abbau	11
1.5	Die quantale und nicht-quantale-ACh-Freisetzung	12
1.5.1	Quantale Transmitterfreisetzung an Synapsen	12
1.5.2	Nicht-quantale-ACh-Freisetzung	13
1.6	Die Funktion des Systems und mögliche Zielzellen	14
1.7	Ziel der Arbeit	17
2.	Material und Methoden	18
2.2	Versuchstiere und Tierhaltung	19
2.3	Tiertötung und Zellisolation	19
2.3.1	Tiertötung	19
2.3.2	Präparation der Spinalganglien	20
2.3.3	Präparation der JNC	20
2.3.4	Präparation der parasympathischen Ganglia pterygopalatina	20
2.3.5	Isolation des Atemwegsepithels	20
2.3.6	Isolation von Alveolarmakrophagen	22
2.4	Zellkultur	23
2.4.1	Allgemeines Passagieren und Einfrieren von Zellen	23
2.4.2	Reporterzellen	23
2.4.3	Fibroblasten	24
2.4.4	L-15 ⁺ -Medium	24
2.4.5	Dissoziieren von Neuronen	24
2.4.6	Locke-Puffer	25
2.4.7	Zellüberstände	25

2.5	Calciumimaging	26
2.5.1	Bestimmung der Zellgröße	28
2.5.2	Auswertung Calciumimaging	29
2.6	cDNA-Synthese isolierter Zellen	31
2.6.1	Reverse Transkription von Einzelzellen	32
2.6.2	Durchführung der <i>single-cell</i> -RT-PCR	33
2.7	RNA-Isolierung aus Gesamtgeweben und Umschreibung	33
2.7.1	RT-PCR	34
2.7.3	Primer	35
2.8	Gelelektrophorese	36
2.9	Organbad	37
2.9.1	Mastzell-defiziente Mäuse	37
2.9.2	Inkubation von Trachealringen mit Botulinumtoxin Typ A	38
2.9.3	Überstände aus Organbadversuchen	38
2.10	Histologische Färbungen	39
2.10.1	Gewebeentnahme, Gewebefixierung und Einfrieren	39
2.10.2	Gewebeverarbeitung	40
2.10.3	Gewebeeinbettung in Paraffin	40
2.10.4	Toluidinblau-Färbung	41
2.10.5	Immunhistochemische Färbung	41
2.10.6	Fluoreszenzmikroskopische Auswertung	42
2.11	ACh-Bestimmung durch HPLC	43
2.11.1	Probengewinnung	43
2.11.2	HPLC-Messung	43
2.12	Statistik	44
3.	Ergebnisse	45
3.1	Quantale oder nqACh-Freisetzung	45
3.2	Bestimmung von ACh	47
3.2.1	Ca ²⁺ Imaging: Einführende Experimente und Vorversuche	47
3.2.2	Organbad: Vorversuch - Kumulierte Dosis-Wirkungskurve	53
3.3	Tracheale ACh-Freisetzung	54
3.4	Epithelfreie Trachealabschnitte als Quelle einer ACh-Freisetzung	56

3.5	Sensorische Neurone als Quelle einer ACh-Freisetzung	57
3.5.1	Co-Kultivierung von sensorischen Neuronen mit mAChR3-Reporterzellen	57
3.5.2	Sensorische Neurone als Quelle einer ACh-Freisetzung Immunhistochemische Färbung von DRG	62
3.5.3	Neurone des JNC als Quelle einer ACh-Freisetzung, immunhistochemische Färbung von JNC	65
3.5.4	Quantitative Bestimmung der ACh-Konzentration mittels HPLC in JNC- und DRG-Neuronen sowie deren Überständen	68
3.6	Parasympathische Neurone als Quelle einer ACh-Freisetzung	69
3.7	Fibroblastenzelllinie MC3T3 als Quelle einer ACh-Freisetzung	71
3.8	Alveolarmakrophagen als Quelle einer ACh-Freisetzung	73
3.9	Mastzellen als Quelle einer ACh-Freisetzung	75
3.10	Trachealepithel als Quelle einer ACh-Freisetzung	77
4.	Diskussion	82
4.1	Die Methode: Ca²⁺-Imaging mit Reporterzellen	82
4.1.2	Applikation von Überständen im Ca ²⁺ -Imaging	84
4.2	Welche Zelltypen der murinen Atemwege kommen für eine ACh-Synthese in Frage?	85
4.2.1	Cholin-Acetyltransferase	85
4.2.2	Cholin-Transporter, insbesondere CTLs	86
4.3	Wie wird ACh aus der Zelle freigesetzt? Findet eine qACh-Freisetzung oder eine nqACh-Freisetzung statt?	88
4.4	Ist eine (nq)ACh-Freisetzung aus verschiedenen Geweben in den Atemwegen funktionell nachweisbar und kann dieses reguliert werden?	89
4.4.1	Co-Kultivierung von Neuronen und Reporterzellen	89
4.4.2	ACh-Bestimmung mittels Reporterzellen in Überständen isolierter Zellpopulationen	90
4.4.3	ACh-Bestimmung mittels HPLC-Messungen	91
4.4.4	Organbadexperimente mit mastzelldefizienten Mäusen	92
4.5	Kann eine non-neuronale ACh-Freisetzung in den Atemwegen funktionell reguliert werden?	92
4.5.1	Steigerung der ACh-Freisetzung durch f-MKKFRW	92

4.6	Mögliche klinische Relevanz _____	94
5.	Zusammenfassung _____	97
6.	Summary _____	98
7.	Abkürzungsverzeichnis _____	99
8.	Abbildungsverzeichnis _____	101
9.	Tabellenverzeichnis _____	102
10.	Literaturverzeichnis _____	103
11.	Publikationsverzeichnis _____	113
12.	Ehrenwörtliche Erklärung _____	114
13.	Danksagung _____	115

1. Einleitung

Acetylcholin (ACh) (Abb.1-1 A), klassischer Transmitter parasymphischer Nervenfasern, ist Haupttransmitter für die Kontraktion der glatten Atemwegsmuskulatur. Zusätzlich zur vesikelvermittelten ACh-Freisetzung nach Stimulation parasymphischer Neurone wurde eine nicht-vesikulär vermittelte (bzw. nicht- oder non-quantale) ACh-Freisetzung nach Eserinbehandlung an präparierten Trachealabschnitten beobachtet, welche in der Lage ist, eine Atemwegskontraktion zu bewirken (Nassenstein et al. 2015). Eserin (Abb.1-1 B) hemmt als Acetylcholinesterase-Inhibitor den Abbau von ACh. Ziel dieser Arbeit war es, mögliche zelluläre Quellen einer ACh-Freisetzung in Atemwegen von Mäusen zu untersuchen.

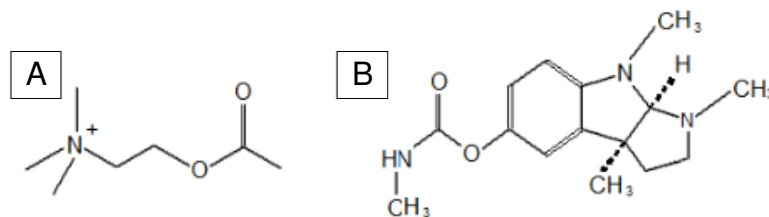


Abb. 1-1: **Strukturformeln von ACh und Eserin.**

Strukturformeln von **A**: Acetylcholin (C₇NH₁₆O₂⁺) und **B**: Eserin (Physostigmin) (C₁₅H₂₁N₃O₂).

1.1 Allgemeine Anatomie der Atemwege

Die Lunge dient dem Gasaustausch zwischen Blut und Luft. Dieser findet in den Alveolen statt. Denen vorgeschaltet ist das konduktive System, bestehend aus der Nase, dem Naso- und Oropharynx, dem Larynx, der Trachea mit folgendem Bronchus principalis dexter und sinister und dem daraus entstehenden Bronchialbaum (Lüllmann-Rauch 2003). Der Innendurchmesser der Atemwege ist von der Trachea bis zu den Bronchiolen abnehmend. Funktionell kann der Innendurchmesser reguliert werden. In Abhängigkeit vom Atemwegsdurchmesser ändern sich der Atemwegswiderstand sowie das Totraumvolumen. Der unterschiedliche Atemwegsdurchmesser spielt nicht nur eine Rolle bei entzündlichen Erkrankungen, sondern auch bei erhöhtem Sauerstoffbedarf, etwa bei vermehrter Anstrengung, wie beim Sport.

Die Atemwege, im Speziellen die Trachea, als großlumig luftleitende, elastische Struktur, setzen sich aus unterschiedlichen Zelltypen zusammen. Ausgekleidet ist die Trachea mit der Tunica mucosa, bestehend aus der Lamina epithelialis mit vorwiegend zilientragenden Zellen, Becherzellen und Basalzellen (Welsch et al. 2018). Darüber

hinaus befinden sich in dieser Schicht Ionozyten, neuroendokrine Zellen und chemosensitive *brush cells*. Letztere wurden als cholinerg Fühler der Atemwege beschrieben und besitzen einen direkten Einfluss auf die Regulation der Atmung, z.B. als Reaktion auf bakterielle Bestandteile (Krasteva et al. 2011; Perniss et al. 2020). Die Lamina propria mit eingelagerten seromukösen Drüsen (Glandulae tracheales/bronchiales) beinhaltet zudem Fibroblasten, Immunzellen, wie Makrophagen, Granulozyten und Lymphozyten, und elastische Fasern. Unter diesem liegt die Tunica fibromusculocartilaginea, bestehend aus den Ligg. anularia, dem M. trachealis und den Knorpelspangen. Als äußere Schicht liegt der Tunica fibromusculocartilaginea die Tunica adventitia auf, die als lockeres Bindegewebe die Trachea in die Umgebung einbaut. Arteriell wird die Trachea durch Rami tracheales der A. thyroidea inf. versorgt, der venöse Abfluss findet über den Plexus thyroideus impar und die V. thyroidea inf. statt. Freie Zellen, wie Alveolarmakrophagen und Lymphozyten können in die Trachea auswandern (Lüllmann-Rauch 2003; Aumüller und Wurzinger 2010).

Die Aufzweigungen des menschlichen Bronchialbaums zeigen ein dichotomes Verteilungsmuster mit von der Trachea bis zu den Alveolen geschätzten 21-23 Verzweigungen. Der Feinbau der Atemwege unterscheidet sich je nach Abschnitt des Bronchialbaumes. Der histologische Aufbau der Bronchien ist dem Aufbau der Trachea sehr ähnlich, jedoch mit Unregelmäßigkeiten der Knorpel einlagerungen in der Tunica fibromusculocartilaginea. Alle Anteile des Bronchialbaums, deren Wände Knorpelgewebe und seromuköse Drüsen enthalten, werden beim Menschen Bronchien genannt. Sobald Drüsen und Knorpel fehlen, werden sie als Bronchiolen bezeichnet. Wesentliche Teile der oberen und der unteren Luftwege bis zu den mittelgroßen Bronchien sind mit typischem respiratorischen Epithel ausgekleidet, das mehrreihig ist. Hingegen besitzen Bronchioli ein einschichtiges Flimmerepithel mit abnehmender Dichte an Becherzellen. In den Bronchioli respiratorii befinden sich kubische, überwiegend zilienlose Zellen (Lüllmann-Rauch 2003).

Die Bronchien der Maus sind mit Knorpel-, Muskel- und Drüsengewebe ausgestattet und mit säulenförmigem Flimmerepithel ausgekleidet. In der Maus befinden sich Knorpelspangen nur in extrapulmonalen Bronchien, während diese weiter intrapulmonal fehlen. In der Mäuselunge führen Bronchioli terminales direkt in die Ducti alveolares ohne erkennbare Bronchioli respiratorii (Scudamore 2014).

Die Lunge besitzt zwei Gefäßsysteme. Die Vasa publica führen das zu oxygenierende bzw. das oxygenierte Blut. Dabei verlaufen die Aa. pulmonales unmittelbar mit den Bronchialbaumabschnitten, wohingegen die Vv. pulmonales an den Segmentgrenzen separat verlaufen. Die Vasa privata, Rami bronchiales und Venae bronchiales, versorgen die bronchialen Strukturen (Aumüller und Wurzinger 2010).

1.2 Innervation der Atemwege

Die Atemwege werden durch parasymphatische, sympathische und sensorische Nervenfasern innerviert.

Studien mittels retrogradem Tracing zeigten, dass präganglionäre parasymphatische, die Trachealwand innervierende Neurone dem Nucleus ambiguus der Medulla oblongata entspringen (Haxhiu et al. 1993; Audrit et al. 2017). Präganglionäre parasymphatische die Lungen innervierende Neurone sind hauptsächlich im Nucleus ambiguus lokalisiert und zu einem geringen Anteil im Nucleus dorsalis nervi vagi zu finden (Hadziefendic und Haxhiu 1999). Gemeinsam ziehen die Nervenfasern mit dem N. vagus zu intramuralen Ganglien, in denen eine Umschaltung auf postganglionäre Neurone stattfindet (Aumüller und Wurzinger 2010; Haxhiu et al. 1993). Postganglionäre cholinerge Nerven stellen mittels ACh-Freisetzung den hauptsächlich bronchokonstriktorschen Signalweg dar (Barnes 1992) und regulieren dadurch den Atemwegsdurchmesser und Atemwiderstand (Widdicombe und Nadel 1963). ACh ist Haupttransmitter des parasymphatischen Nervensystems und wird sowohl bei der Umschaltung vom ersten aufs zweite Neuron als auch bei der Signalübertragung vom zweiten Neuron auf das Erfolgsorgan ausgeschüttet (Koopman et al. 2011; Waxenbaum et al. 2020).

Die viszeromotorischen Perikarya des Sympathikus liegen im ZNS in den deutlich sichtbaren Seitenhörnern des thorakalen und lumbalen Rückenmarks. Postganglionäre Neurone des Ggl. stellatum (eine Fusion aus dem Ggl. T1 und dem Ggl. cervicale inferius) sowie die Grenzstrangganglien T2-T4 innervieren die Lunge sympathisch (Kummer et al. 1992). Transmitter vom ersten auf das zweite Neuron ist ACh. Vom zweiten Neuron auf das Erfolgsorgan wird meist Noradrenalin als Transmitter ausgeschüttet. In sympathischen Neuronen konnte ebenfalls das Neuropeptid Y (NPY) gezeigt werden (Kummer et al. 1992; Koopman et al. 2011; Waxenbaum et al. 2020). Die Transmitterfreisetzung der postganglionären Neurone bewirkt an den Effektorzellen u.a.

eine Gefäßverengung, einen Herzfrequenzanstieg, Schweißsekretion sowie eine Erweiterung der Bronchien (Audrit et al. 2017; Karemaker 2017). Die Trachea wird von Neuronen des Ggl. stellatum sowie des Ggl. cervicale superius versorgt (Kummer et al. 1992).

Sensorisch wird die Lunge durch unterschiedliche Subpopulationen von Neuronen innerviert. Zum größten Teil befinden sich deren Zellkörper im Ggl. inferius n. vagi (Ggl. nodosum; Ursprung aus Plakoden) und Ggl. superius n. vagi (Ggl. jugulare; Ursprung aus Neuralleiste), die speziesabhängig fusioniert sein können, wie z.B. bei der Maus, und dann als Komplex vorliegen (*jugular nodose complex (JNC)*) (Düring und Andres 1988). Sensorische Neurone, die die Lunge innervieren, sind sowohl im Ggl. jugulare und nodosum als auch in den oberen thorakalen Spinalganglien lokalisiert. Trachea-innervierende Neurone fanden sich bilateral in den Ggll. nodosa, weniger in den Ggll. Jugulares, während sie nicht in Spinalganglien nachgewiesen wurden konnten (Kummer et al. 1992). Unterschieden werden dabei A- und C-Faser-Neurone. C-Faser-Neurone besitzen unmyelinisierte Nervenfasern, die durch physikalische, chemische und thermische Stimuli erregt werden können. Die Mehrheit der C-Faser-Neurone besitzt *transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1)* Rezeptoren, ein Rezeptor aus der großen Familie der TRP-Kanäle (Pedersen et al. 2005). Der TRPV1-Rezeptor ist durch Capsaicin, das u.a. aus der roten Chilischote gewonnen wird, stimulierbar (Caterina et al. 1997). Im Vergleich zu C-Faser-Neuronen aus dem plakodal entstandenen Anteil des JNC exprimieren die Neurone des jugulären Anteils sowie Spinalganglienneurone (gleiche embryonale Herkunft) mRNA des Präprotachykinins, aus dem durch Spaltung das Neuropeptid Substanz P (SP) entsteht. Des Weiteren wird mRNA des *calcitonin gene-related peptide (CGRP)* exprimiert, das durch Splicing aus dem Gen CALCA und der prä-mRNA entsteht. Die A-Faser-Population besteht aus myelinisierten nicht-peptidergen Mechanorezeptoren, deren Nervenendigungen u.a. mit glatter Atemwegsmuskultur assoziiert sind. A-Fasern sind weiter zu unterscheiden in langsame und schnelle Dehnungsrezeptoren. Letztere vermitteln den Hering-Breuer-Reflex, welcher die Inspiration nach dem Erreichen eines definierten Dehnungsgrades beendet. (Luck 1970; Krauhs 1984; Nassenstein et al. 2010).

1.2.1 Sensorische Neurone des N. vagus

Die vagalen sensorischen Neurone können in zwei Untergruppen gegliedert werden. Bei der Maus lassen sich aus der Neuralleiste abstammend Neurone von Neuronen plakodalen

Ursprungs unterscheiden. Im JNC liegen die Neuralleistenneurone mehr rostral, wohingegen die plakodalen Neurone am kaudalen Pol gelegen sind. Nicht nur anhand ihrer anatomischen Lagen lassen sich die beiden neuronalen Subpopulationen unterscheiden, sondern auch anhand ihrer Rezeptoren. P2X2, ein purinerge Rezeptor, wird selektiv in C-Faser-Neuronen plakodalen Ursprungs exprimiert und fehlt in Neuronen aus der Neuralleiste. Mittels *α,β -methylene ATP*, einem P2X2/3 selektivem Agonisten, können die Neurone mit Neuralleistenabstammung und die Neurone plakodalen Ursprungs funktionell voneinander unterschieden werden (Nassenstein et al. 2010).

Die sensorische Innervation der Trachea und Lunge wurde mittels retrogradem Tracing untersucht. Es konnte in Meerschweinchen gezeigt werden, dass lungeninnervierende sensorische Neurone im Ggl. jugulare und nodosum sowie höheren thorakalen Spinalganglien liegen. Die die Trachea innervierenden Neurone befinden sich beidseits überwiegend im Ggl. nodosum, im Vergleich weniger im Ggl. jugulare (Kummer et al. 1992). Zuvor wurde mit ähnlicher Technik in Ratten gezeigt, dass die Innervation von Trachea und Lunge durch Neurone des JNC sowie Neurone der DRG erfolgt. Der rechte N. vagus ist hierbei im Gegensatz zum linken überwiegend beteiligt. Bei Injektion des blauen Farbstoffes in die Trachea waren 65 % der angefärbten Neurone in den rechten vagalen Ganglien und 35 % der angefärbten Neurone in den linken vagalen Ganglien zu sehen. In beiden Fällen waren mehr Zellkörper in den Abschnitten plakodalen Ursprungs angefärbt als in den der Neuralleiste abstammenden Abschnitten. Tracing mit anschließender Immunhistochemie zeigte, dass ca. 96% der angefärbten Neuralleistenneurone CGRP⁺ und nur ca. 4% der angefärbten plakodalen Neurone CGRP⁺ waren (Springall et al. 1987).

Bei Injektion des Farbstoffes in die Lunge waren mehr sensorische Neurone angefärbt als bei Injektion in die Trachea. Bei getrennter Farbstoffinjektion der linken und rechten Lunge wurde gezeigt, dass sich die überwiegende Mehrheit der lungeninnervierenden Neurone auf der ipsilateralen Seite befinden, mehrheitlich in den Ganglien plakodalen Ursprungs. In Bezug auf die Spinalganglien waren bei der Tracer-Applikation in die linke Lunge mehr Zellen im Bereich der Spinalganglien T1-T3 und T6-7 angefärbt, bei Tracer-Applikation der rechten Lunge waren v.a. die Neurone der Abschnitte T2 sowie T7-T8 markiert (Springall et al. 1987).

Dem gegenüber steht eine Studie von Dalsgaard und Lundberg, in der nach Injektion eines Tracers kein eindeutiger Unterschied in Bezug auf die Innervation zwischen rechten und linken Ggl. n. vagi gezeigt wurde. In dieser Studie waren 60 % der angefärbten Neurone plakodalen Ursprungs und 20 % hatten ihren mit Ursprung aus der Neuralleiste. Zwanzig Prozent entsprangen den DRG, v.a. aus T2-3 (Dalsgaard und Lundberg 1984).

1.3 Das neuronale und nicht-neuronale cholinerge System

ACh ist ein klassischer Transmitter parasymphatischer Nervenfasern in den Atemwegen. Es wird darüber hinaus durch eine Vielzahl nicht-neuronaler Zellen synthetisiert. Im Nervensystem wird der Transmitter ACh innerhalb der Nervenendigungen in Vesikeln gespeichert und auf einen Reiz hin per Exozytose ausgeschüttet. Außerhalb des neuronalen Systems erfolgt die Freisetzung meist langsamer und in niedrigeren Konzentrationen und nach weniger bekannten Mechanismen. ACh wird von vielen Zellen produziert und spielt eine Rolle bei Interaktionen mit der Umwelt, Hormonen, Wachstumsvorgängen, Zytokinen und dem neuralen System. Die Synthese von ACh wurde u.a. in unterschiedlichen humanen Zellen nachgewiesen, wie z.B. zillientragenden- und sekretorischen Zellen der Atemwege, Keratinozyten, Makrophagen und Mastzellen der Haut, Tubuli der Nieren, Trophoblasten der Plazenta, Cornea des Auges, dem Urothel der Harnblase und Drüsengewebe der Mamma und dem Thymus sowie Endothel und Immunzellen. Es ist nachgewiesen, dass die meisten nicht cholinerg innervierten Zellen nikotinische (nAChR) und muskarinische (mAChR) ACh-Rezeptoren exprimieren und Teil von regulatorischen Kreisläufen von nicht-neuronal freigesetztem ACh darstellen. In unterschiedlichen Spezies wurde eine Expression von n- und mAChR in u.a. Atemwegsepithel, Melano- und Keratinozyten, Kolonepithel, Ovarialzellen, Urothel, Endothel, Immunzellen und Fibroblasten nachgewiesen (Wessler und Kirkpatrick 2008; Kummer et al. 2008).

1.4 ACh-Synthese und cholinerge Rezeptoren

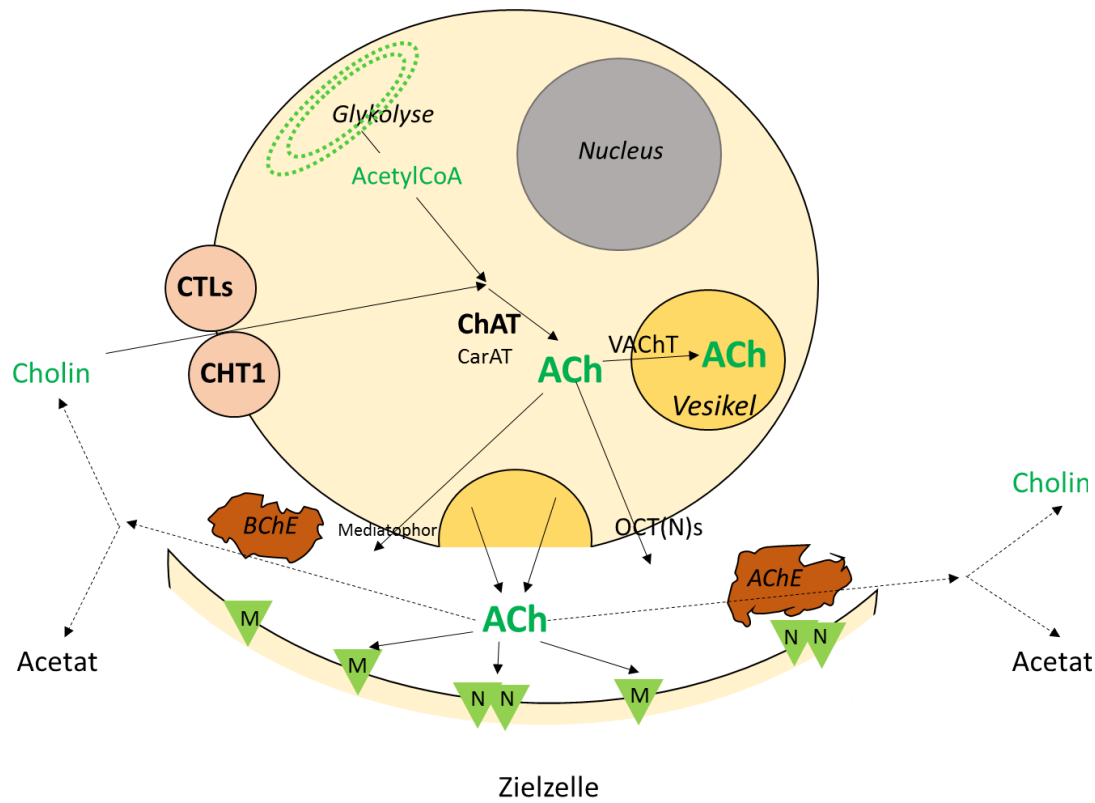


Abb. 1-2: Wege der ACh-Synthese, Freisetzung und des Abbaus.

ACh, Acetylcholin; AChE, Acetylcholinesterase; BChE, Butyrylcholinesterase; ChAT, Cholin-Acetyltransferase; CHT1, *high-affinity choline transporter 1*; CTLs, *choline transporter-like* Proteine; M, muskarinische Rezeptoren; N, nikotinische Rezeptoren, OCT(N)s: organische Kationen-Transporter

1.4.1 Cholin-Transporter

Die Aufnahme des Cholins in die Zelle ist über verschiedene Wege möglich. Die Cholin-Transporter können in drei Gruppen aufgeteilt werden. Unterschieden werden die (a) *low-affinity facilitated diffusion*, (b) *high-affinity*, Na⁺-abhängige Transporter, und (c) *intermediate-affinity*, Na⁺-abhängige Transporter. Die genannten Gruppen beinhalten (a) *polyspecific organic cation transporters* (OCTs) mit geringer Affinität zu Cholin, (b) den *high-affinity choline transporter* (CHT1), und (c) *intermediate-affinity choline transporter-like* (CTL) Proteine (Michel et al. 2006). Grundsätzlich besitzt jede Zelle ein Aufnahmesystem für Cholin, da die Synthese des Membranlipids Phosphatidylcholin überlebenswichtig für die Zelle ist. Der CHT1 ist eine Möglichkeit der Cholin-Aufnahme in die Zelle. Die Na⁺-abhängige Aufnahme von

Cholin durch CHT1 ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt für die Synthese von ACh in Neuronen (Haga 2014). CHT1-mRNA konnte mittels Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) zusätzlich zu Neuronen auch in Tracheen nach Entfernung des Epithels sowie mechanisch gelöstem Atemwegsepithel nachgewiesen werden (Pfeil et al. 2003).

Der Familie der CTLs gehören die 5 Isoformen CTL1-CTL5 an, wobei sich jeweils CTL1 und CTL3 sowie CTL2 und CTL4 ähneln. CTL5 ist näher mit CTL2 oder CTL4 verwandt. Die unterschiedlichen Transporter sind in unterschiedlichen Geweben nachweisbar. CTL1 als Hauptmitglied der CTL-Familie ist v.a. im Hirn, Neuronen, sowie Gliazellen nachweisbar. CTL2 und CTL4 sind v.a. in peripheren Geweben detektierbar. Die CTLs besitzen 10 transmembrane Domänen (O'Regan et al. 2000). Besonders interessant ist der CTL4, der anscheinend als einziger einen besonderen Einfluss auf die ACh-Synthese hat. Song et al. haben gezeigt, dass die Reduktion von CTL4 im Gegensatz zu den anderen CTLs zu einer verringerten ACh-Sekretion und -Synthese in H82 Lungenkarzinomzellen führt. Es erscheint, als wäre CTL4 in besonderer Weise mit einer ACh-Synthese und -Freisetzung verbunden. (Song et al. 2013). CTL1-5 wurden mittels RT-PCR in Trachealepithel und Trachealabschnitten ohne Epithel mit und ohne Knorpel nachgewiesen. Damit liegt die Vermutung nahe, dass das Trachealepithel nicht das einzige Gewebe ist, das CTLs exprimiert und aus diesem Grund weitere Zelltypen als Quelle einer nqACh-Freisetzung diskutiert werden müssen (Nassenstein et al. 2015).

Zusätzlich zu den genannten Transportsystemen spielen die OCTs eine wichtige Rolle beim Cholintransport. Die polyspezifischen Kationtransporter besitzen 12 membranspannende α -Helices. OCT3 wurde im Vergleich zu OCT1 und OCT2 in weitaus mehr Organen nachgewiesen, so findet man diesen u.a. besonders stark in Skelettmuskulatur, Leber oder Drüsengewebe. OCT1 wird von Epithelzellen sowie einigen Neuronen exprimiert (Koepsell et al. 2007).

1.4.2 ACh-Synthese

ACh wird durch das Enzym Cholin-Acetyltransferase (ChAT) aus Acetyl-Coenzym A (AcetylCoA) und Cholin synthetisiert. Die vorhandene Expression der ChAT spricht für eine ACh-Synthese und für die Ausschüttung des Transmitters durch die Zelle.

1.4.2.1 Cholin-Acetyltransferase

Die ChAT ist das wichtigste Enzym zur Bildung von ACh aus Acetyl-CoA und Cholin und somit ist die Expression ein wesentliches Charakteristikum cholinergischer Strukturen. Neurone nutzen den *vesicular acetylcholine transporter* (VACHT), um ACh in Vesikel zu verpacken. Das ChAT-Gen besitzt drei nicht-codierende Introns (R, N, M) und 15 codierende Exons. Durch alternatives Splicen im codierenden Bereich entstehen der *common* (cChAT) und *peripheral* (pChAT) Typ der ChAT. Im Vergleich zur cChAT fehlen der pChAT Exon 6-9 (Abb.1-3, gelb markiert). Während cChAT im zentralen (ZNS) und auch im peripheren Nervensystem (PNS) nachweisbar ist, ist pChAT bevorzugt im peripheren Nervensystem exprimiert und erscheint als sensibler Marker, dessen Nachweis sogar gelingt, wenn cChAT nicht nachgewiesen werden kann (Bellier und Kimura 2011).

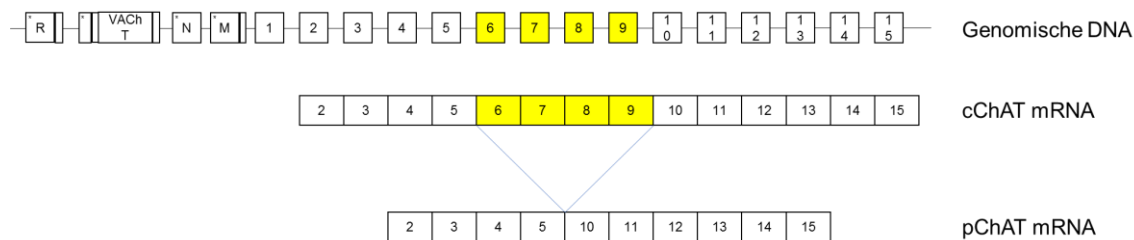


Abb. 1-3: **Cholin-Acetyltransferase-(ChAT) Varianten.**

Struktur des cholinergen Genlocus. Drei nicht-codierende (R, N, M) und 15 codierende Exons. Unterschiedliche Transkriptionsstarts (*). Durch Alternatives Splicing entstehen die cChAT oder die pChAT (ohne Exon 6-9, gelb). - Intron.

Das VACHT-Gen ist im ersten Intron des ChAT-Gens vollständig enthalten (Erickson et al. 1994). Es gibt eine Vielzahl an ChAT-Varianten, von einem Gen entstammend mit so ausgeprägten Unterschieden, dass Antisera gegen ChAT von Neuronen des ZNS häufig nicht mit ChAT des PNS reagieren, was eine gründliche Untersuchung der peripheren cholinergen Neurone und auch des non-neuronalen cholinergen Systems für lange Zeit schwierig machte (Kummer et al. 2008).

Als alternativer Syntheseweg von ACh via ChAT existiert u.a. die Carnitin-Acetyltransferase (CarAT), die, wenn auch ineffizienter, ACh in Skelettmuskelfasern der Ratten produziert (Tuček 1982; Kummer et al. 2008). Des Weiteren könnte die CarAT im Urothel für die ACh Synthese verantwortlich sein (Lips et al. 2007b). Vesikuläre ACh-Speicherung ist nicht die Regel in non-neuronalen Zellen, sodass dies die Annahme bestärkt, dass es sich um eine direkte Freisetzung von ACh aus der Zelle bzw. eine Freisetzung durch weitere Transporter und nicht vesikel-vermittelt handelt.

Seither wurden unterschiedliche Arbeiten zu dem Thema verfasst. Nach einem Review von Wessler und Kirkpatrick sind nahezu alle lebenden Zellen in der Lage, ACh zu produzieren (Wessler und Kirkpatrick 2008). Die ACh-Synthese ist aber nicht allein von der ChAT abhängig, die Mehrheit der ACh-produzierenden Zellen zeigt jedoch eine ChAT-Enzymaktivität. U.a. wurden ChAT-mRNA und ChAT-Protein in isolierten menschlichen Epithel- und Immunzellen nachgewiesen (Klapproth et al. 1997; Grando et al. 1993). Entsprechend ist auch die Rolle des ACh vielfältig.

Kawashima et al. beschäftigt sich mit der Expression cholinergischer Komponenten in Immunzellen von Mäusen. Mittels RT-PCR konnte er mRNA für alle mAChR und Untereinheiten des nAChR nachweisen. In ruhenden Immunzellen (monozytäre Leukozyten und dendritischen Zellen) konnte kein ChAT nachgewiesen werden. Nach Stimulation mit u.a. Lipopolysacchariden war ein ChAT-Nachweis induzierbar. Seine Arbeit unterstützt die Annahme, dass ACh an der Modulation und Entwicklung von Immunzellen beteiligt sein könnte (Kawashima et al. 2007).

1.4.3 Cholinerge Rezeptoren

1914 wurden die ACh-Rezeptoren durch Sir Henry Dale in zwei Klassen unterteilt, die nAChR und mAChR (Fryer und Jacoby 1998). Die mAChR sind überwiegend auf Zielzellen, wie glatter Atemwegsmuskulatur, Epithel und Drüsengewebe exprimiert. Des Weiteren befinden sich mAChR auf postganglionären parasymphatischen Nervenfasern. Sie können sowohl hemmende als auch erregende Funktion haben. Die nAChR sind u.a. in vegetativen Ganglien oder an motorischen Endplatten der Motoneurone anzutreffen und wirken erregend (Welsch und Deller 2011; Fryer und Jacoby 1998).

1.4.3.1 Muskarinische Rezeptoren

Die mAChR können in M1-M5-Rezeptoren unterteilt werden (Caulfield und Birdsall 1998). M1-, M3- und M5-Rezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und führen über den Phospholipase C-Signalweg zu einer Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern. M2- und M4-Rezeptoren sind ebenfalls G-Protein gekoppelte Rezeptoren und inhibieren die Adenylatcyclase (Caulfield 1993). Die Expression der Rezeptoren variiert in unterschiedlichen Geweben. Die Kontraktion der glatten Muskulatur z.B. wird hauptsächlich durch die Stimulation des M3-Rezeptors vermittelt (Eglen et al. 1996). ACh postganglionärer cholinergischer Nervenfasern stellt über M3-Rezeptoren den

hauptsächlich bronchokonstriktiven Signalweg der glatten Muskelzellen dar (Barnes 1992).

1.4.3.2 Nikotinerge Rezeptoren

Die nAChR bilden eine heterogene Familie. Sie bestehen aus Pentameren verschiedener Untereinheiten (UE), deren Vielfalt aufgrund einer möglichen Kombinationen der bekannten neun $\alpha(2-10)$ und drei $\beta(2-4)$ -UE groß ist (Gotti et al. 2009; Corringer et al. 2006). Im Muskel bestehen die embryonalen nAChR aus zwei α -, und je einer β -, γ - und δ -UE. Die γ -UE wird in adulten Rezeptoren nAChR durch die ε -UE ersetzt (Mishina et al. 1986). nAChR sind ionotrope Kanäle und nicht nur permeabel für einwertige Na^+ - und K^+ -Ionen, sondern auch für Ca^{2+} (Gotti et al. 2009; Fucile 2004). Die unterschiedlichen Subtypen dieses Rezeptors spielen eine wichtige Rolle bei Krankheiten und in der Pharmakologie. Es wurde gezeigt, dass die nAChR im Nervensystem aus $\alpha 7$ -Homopentameren oder α, β -Heteropentameren bestehen. Die $\alpha 4 \beta 2$ -Rezeptoren sind verantwortlich für 90% der hochaffinen neuronalen nAChR im Gehirn von Säugetieren und $\alpha 3 \beta 4$ -Rezeptoren sind der prädominante Subtyp in autonomen Ganglien sowie im Nebennierenmark (Gotti et al. 2009; Gotti und Clementi 2004; Albuquerque et al. 2009). Ein weiteres Beispiel der Spezifität einzelner UE ist die $\alpha 9$ -UE des nAChR. Diese UE ist prädominierend in der Cochlea nachweisbar und spielt eine Rolle bei der Entwicklung synaptischer Verbindungen zwischen efferenten Fasern und Haarzellen (Vetter et al. 1999). Des Weiteren spielt die $\alpha 9$ -UE eine wichtige Rolle bei der Schmerzmodulation und der Behandlung von neuropathischem Schmerz (Wonnacott et al. 2018; Hone et al. 2018).

1.4.4 ACh-Abbau

Cholinesterasen katalysieren die Hydrolyse von ACh. Das abgebaute Hydrolyseprodukt, Cholin, wird anschließend wieder in die Zelle aufgenommen.

AChE ist in vielen Geweben nachweisbar: Nerven- und Muskelgewebe, motorische und sensorische Nervenfasern sowie cholinerge Fasern. Die Butyrylcholinesterase (BChE), auch Plasmacholinesterase oder Pseudocholinesterase genannt, zeigt sich hauptsächlich in der Leber, aber auch anderen Organen, einschließlich der Atemwege. Ein bedeutender Unterschied ist, dass die AChE das ACh deutlich schneller hydrolysiert als die BChE (Colović et al. 2013). Des Weiteren ist die Spezifität der AChE, auch „spezifische Cholinesterase“, zu ACh deutlich höher als die der BChE. Die BChE spaltet

unspezifischer deutlich mehr als die AChE, u.a. Butyrylcholin oder Succinylcholin, und katalysiert auch die Hydrolyse von Kokain, Heroin oder Acetylsalicylsäure (Darvesh et al. 2003).

Die Wände der Atemwege enthalten sowohl AChE als auch die BChE. Histochemische Färbungen haben AChE-Aktivität vor allem in Nervenfasern zwischen glatter Atemwegsmuskulatur nachgewiesen. Des Weiteren konnte AChE-Aktivität auch in der Adventitia gezeigt werden. Einige positive Fasern waren in der Submukosa lokalisiert. Im Epithel waren keine AChE-positiven Fasern detektierbar. In der Trachealmuskulatur war deutlich BChE-Aktivität nachweisbar, jedoch nicht in Submucosa oder Trachealepithel (Small et al. 1990). ACh wird physiologischerweise hauptsächlich durch die AChE gespalten. In Abwesenheit von AChE-Aktivität kann die BChE die Funktion der AChE teilweise kompensieren (Li et al. 2000; Nassenstein et al. 2015).

1.5 Die quantale und nicht-quantale-ACh-Freisetzung

Es unterscheiden sich zwei Mechanismen der Neurotransmitterfreisetzung. Bei der vesikelvermittelten (quantalen) Transmitterfreisetzung werden spezielle Zellorganellen aus den axonalen Nervenendigungen in den synaptischen Spalt freigesetzt. Das freigesetzte ACh aktiviert postsynaptische ACh-Rezeptoren (Katz 1971). Die weitere Möglichkeit ist eine nicht-quantale (nq; nicht vesikelvermittelte) Transmitterfreisetzung via membranständiger Proteine, wie Mediatophore (Israël und Dunant 1999).

1.5.1 Quantale Transmitterfreisetzung an Synapsen

In Neuronen beginnt die synaptische Übertragung mit der vesikulären Exozytose von Transmittern. Kommt es zur Depolarisation der präsynaptischen Zellmembran, werden spannungsabhängige Calciumkanäle geöffnet. Das eingeströmte Calcium bindet in den membranständigen Regionen der Freisetzungsstellen an Synaptotagmin. Es kommt zu einer Konformationsänderung, wodurch die sterische Blockade des SNARE-Komplexes aufgehoben wird. Der SNARE-Komplex besteht aus zwei Plasmaproteinen (Syntaxin und SNAP-25) und einem Protein der Vesikelmembran (Synaptobrevin). Reißverschlussartig wird der Vesikel an die Zellmembran gezogen, bis es zur Fusion kommt und sich der Inhalt des Vesikels in den synaptischen Spalt entleert. Der SNARE-Komplex kann durch Toxine anaerob wachsender Bakterien gehemmt werden. Die Tetanus- und Botulinum-Toxine wirken enzymatisch auf Proteine des SNARE-Komplexes. Tetanustoxin und die Botulinumtoxine B, D, F und G spalten

Synaptobrevin, während andere Botulinumtoxine mit SNAP25 oder Syntaxin interagieren (Klinke et al. 2010).

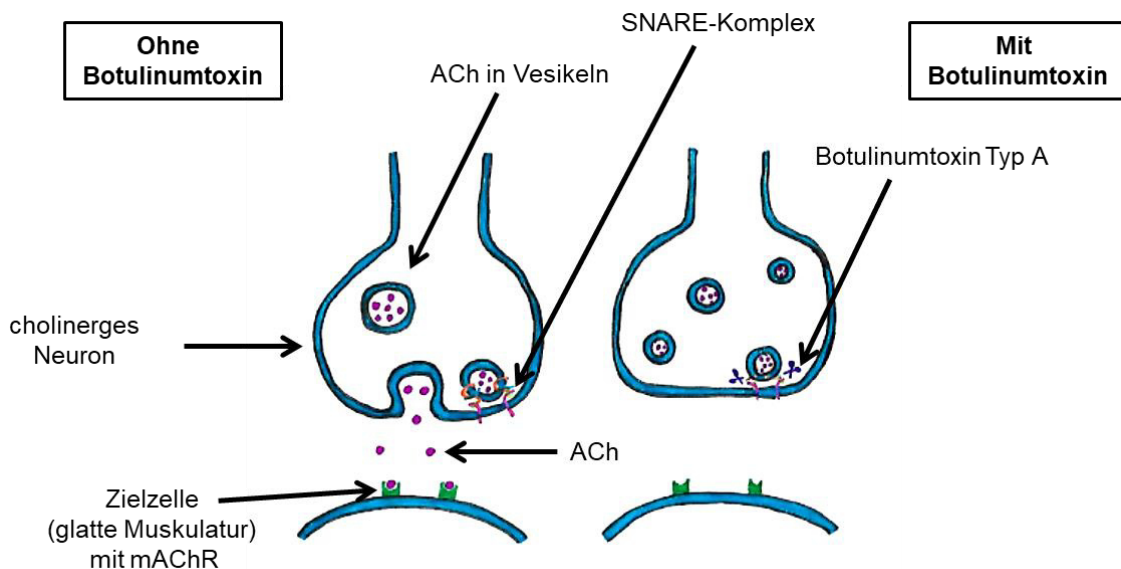


Abb. 1-4: Schematische Darstellung der Wirkung von Botulinumtoxin.

Links die Freisetzung von ACh aus präsynaptischen Vesikeln, rechts schematische Darstellung der Wirkung von Botulinumtoxin Typ A, die in einer fehlenden Freisetzung von ACh aus präsynaptischen Vesikeln resultiert.

1.5.2 Nicht-quantale-ACh-Freisetzung

Über Jahrzehnte stand das quantal freigesetzte ACh im Fokus der Forschung. Zusätzlich zur nqACh-Freisetzung durch parasympathische Nervenfasern, die die glatte Atemwegsmuskulatur und Drüsen innervieren, existiert eine nqACh-Freisetzung durch eine Vielzahl von non-neuronalen Zellen, wie z.B. Zellen des Atemwegsepithel (Kummer et al. 2008).

Eine Vielzahl von Zellpopulationen ist in der Lage ACh zu produzieren und freizusetzen. Cholinerge Neurone setzen auf einen Stimulus ACh per Exozytose frei. Es besteht die Annahme, dass die Konzentration an nicht-vesikulär freigesetztem ACh ohne Hemmung der AChE keine postsynaptische Antwort bewirkt. Die Hemmung der AChE zur Steigerung der ACh-Konzentration ist notwendig, um einen Effekt auf die Zielzelle zu erreichen. Um den Mechanismus der nqACh-Freisetzung ohne elektrische oder pharmakologische Stimulation zu verstehen, wurden verschiedene Inhibitoren verwendet, die jeweils spezifische ACh-Transporter blockieren. In der Studie von Nassenstein et al. (2015) konnte ausschließlich ein von Hemicholinium-3 (HC-3), Blocker der CHT1 in geringer Konzentration und Inhibitor der CTLs in hoher Konzentration, abhängiger

Effekt gezeigt werden, der zu einer signifikant reduzierten trachealen Kontraktion im Organbad führte. Die daraufhin durchgeführte RT-PCR zeigte eine mRNA-Expression von CTL1-5 (Nassenstein et al. 2015). Dabei ist der CTL4 hervorzuheben, denn die Reduktion von CTL4 führt im Gegensatz zu den anderen CTLs zu einer verringerten ACh-Sekretion und -Synthese in H82 Lungenkarzinomzellen. CTL4 ist in besonderer Weise mit einer nqACh-Freisetzung verbunden (Song et al. 2013).

In einer Studie von Kummer et al. wurde gezeigt, dass in den Atemwegen von OCT1/2^{-/-} Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen die nachgewiesene intrazelluläre epitheliale ACh-Konzentration das Doppelte betrug. Dieses Erkenntnis unterstützt die Vermutung, dass OCT1/2 eine Rolle in der ACh-Freisetzung aus Atemwegsepithel spielen (Kummer et al. 2006). In der menschlichen Placenta findet die nqACh-Freisetzung v.a. durch OCT 1/3 statt (Wessler et al. 2001).

Eine weitere Freisetzungsmöglichkeit ist das Mediatophore, ein Proteolipid, das eine direkte ACh-Freisetzung ermöglicht bzw. eine Fusionspore zwischen synaptischem Vesikel und Plasmamembran bildet (Morel 2003).

1.6 Die Funktion des Systems und mögliche Zielzellen

Phylogenetisch scheint das non-neuronale System in biologischen Systemen weitaus älter zu sein als das neuronale ACh-System (Wessler et al. 1999). Erstmals beschrieben wurde eine nqACh-Freisetzung bei Mitchell et al. (1963) in Untersuchungen an einem denervierten Hemidiaphragma nach Applikation von Eserin (AChE-Inhibitor). Die Mehrheit der humanen Zellen synthetisiert ACh. In humanen Geweben wurde ACh bzw. synthetisierende Enzyme in epithelialen (Atemwegen, Urogenitaltrakt, Epidermis), in mesothelialen (Pleura und Perikard) und endothelialen, Muskelzellen sowie in Immunzellen (Granulozyten, Lymphozyten und Makrophagen) nachgewiesen. Eine Beobachtung, die die Vielzahl an ubiquitär exprimierten ACh-Rezeptoren und der AChE erklären würde (Wessler et al. 1999).

Die Arbeitsgruppe von Chávez et al. hat sich mit der nqACh-Freisetzung in den Atemwegen von Meerschweinchen und der Rolle der CTLs beschäftigt. Sie konnten zeigen, dass cholinerge Nervenfasern in den Atemwegen der Meerschweinchen nqACh freisetzen und CTLs an dessen Bildung und Freisetzung beteiligt sind. Erstmals wurde in der Arbeit eine Wirkung des freigesetzten nqACh auf glatte Muskulatur gezeigt (Chávez et al. 2011).

Das non-neuronale System ist in zellregulatorische Wege involviert. Via nAChR und mAChR sowie direkter Interaktion mit Signalwegen, wie Ionenkanälen oder Schlüsselenzymen, kann ACh die meisten zellulären Signalwege beeinflussen. So kann ACh die Mitose, Differenzierungen, Organisation des Zytoskeletts, Zell-Zell-Kontakte, Lokomotion, Migration, Sekretion und Absorption steuern (Wessler et al. 1999).

Vyskocil et al. beschrieben die non-quantale Transmitterfreisetzung als wichtigen Faktor der Synaptogenese. Sie beeinflusst die Innervation bei der Entwicklung des Muskels und schützt das Ruhemembranpotential in depolarisierten Neuronen (Vyskocil et al. 2009).

Die Atemwege bestehen aus einer Vielzahl differenzierter Zellen, die potenziell an einer nqACh-Freisetzung beteiligt sein können (Abb.1-5; Vgl. Kapitel 1.1).

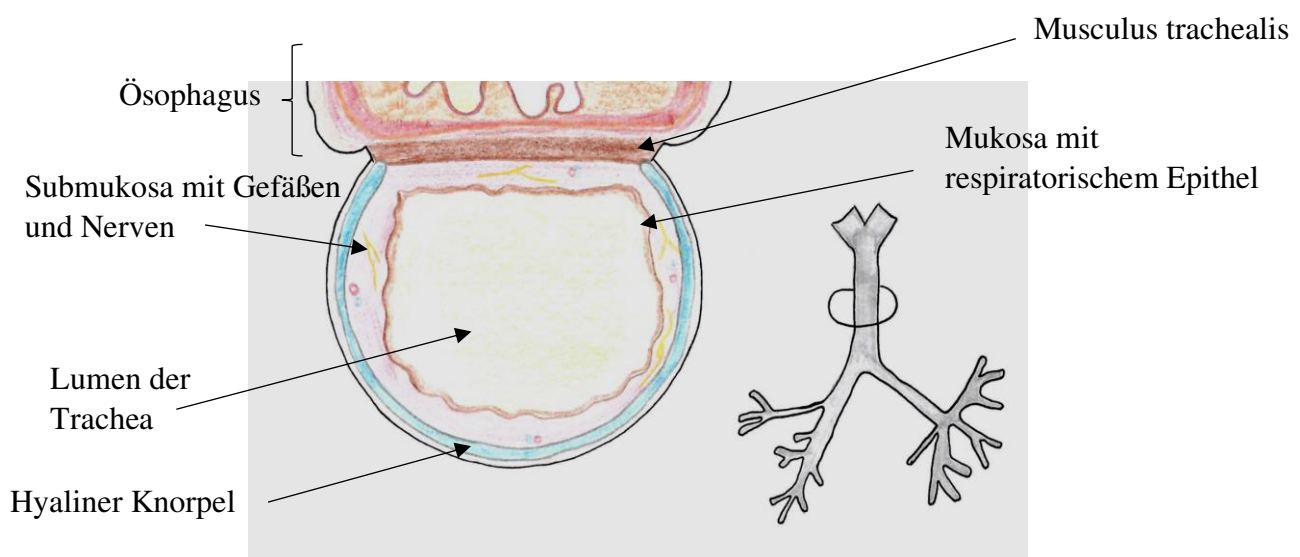


Abb. 1-5: Schematische Darstellung und Wandaufbau der Trachea.

Querschnitt durch die Trachea. Mit Pfeilen sind anatomische Strukturen bezeichnet, die neuronale und nicht-neuronale cholinerge Zellen enthalten.

Diesbezüglich waren verschiedene Zellpopulationen von Interesse. Nassenstein et al. (2015) zeigten, dass auch nach Entfernung des Atemwegsepithel von isolierten Tracheen eine eserlin-induzierte Kontraktion beobachtet werden konnte. Diese war nicht signifikant unterschiedlich zu der Kontraktion in Anwesenheit des Epithels. Dies zeigt, dass nicht nur das Atemwegsepithel eine Rolle bei der nqACh-Freisetzung spielt. Die Studie erbrachte den Nachweis für eine epithelunabhängige, nicht-vesikulär vermittelte ACh-Freisetzung in den Atemwegen der Mäuse unter Einbeziehung der CTL (Nassenstein et al. 2015). Mittels Immunfluoreszenz konnte ChAT im Atemwegsepithel sowie in glatter Atemwegsmuskulatur nachgewiesen werden. Atemwegsmuskulatur ist eine mögliche

Quelle einer ACh-Freisetzung (Wessler und Kirkpatrick 2001). Auch andere Zellen, wie z. B. vaskuläres Endothel des Hirn (Parnavelas et al. 1985), Endothel des Truncus pulmonalis (Haberberger et al. 2000) oder Immunzellen (Wessler et al. 1999; Kawashima et al. 1998) exprimieren ChAT-Protein oder ChAT-mRNA und können als mögliche Quelle in Frage kommen. Darüber hinaus sind auch nicht-neuronale Zellen, wie sensorische Neurone (z.B. aus DRG und JNC) eine mögliche Quelle einer nqACh-Freisetzung. In lumbalen DRG von Ratten konnte pChAT mittels Immunhistochemie in kleinen und teils mittelgroßen DRG-Neuronen und einem Teil der Nervenfasern gezeigt werden. cChAT-Antikörper färbten hingegen keinerlei Strukturen im DRG (Bellier und Kimura 2007). Entsprechend waren die sensorischen lungen-innervierenden Neurone aus DRG und JNC von Interesse und wurden auch in funktionellen Ca^{2+} -Messungen untersucht. Abschließend könnten auch cholinerge Neurone selbst in der Lage sein, non-quantal ACh freizusetzen. In Bezug auf klinisch pathophysiologische Mechanismen wie bei Fibrose, (chronischer) Entzündung oder Infektionen kann es zu einem Atemwegsumbau kommen, an dem ACh eine Rolle spielen kann (Kistemaker und Gosens 2015). Aus diesem Grund standen auch Fibroblasten, Mastzellen und Makrophagen im Fokus dieser Untersuchungen.

1.7 Ziel der Arbeit

Als Ausgangshypothese wird angenommen, dass unterschiedliche Zellen in den Atemwegen der Mäuse in der Lage sind, ACh zu produzieren und freizusetzen. Bisher liegen unzureichende Studien vor, die die zellulären Quellen des ACh in den Atemwegen von Mäusen definieren.

In der vorliegenden Arbeit sollen folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

1. Welche Zelltypen der murinen Atemwege exprimieren CTLs, CHT1 und ChAT und kommen daher für eine (nq)ACh-Freisetzung oder ACh-Synthese in Frage? Zur Bearbeitung dieser Fragestellung wurden RT-PCR und *single cell* RT-PCR Versuche durchgeführt und isolierte Zellen und Gewebe auf eine mRNA Expression genannter Transporter und Enzyme untersucht. Zusätzlich wurden immunhistochemische Markierungen von sensorischen Ganglien sowie Trachea und Lunge vorgenommen.
2. Ist eine nqACh-Freisetzung aus verschiedenen Geweben in den Atemwegen funktionell nachweisbar und kann dieses reguliert werden? Hierzu wurden Organbadversuche mit isolierten Trachealabschnitten durchgeführt. Darüber hinaus wurden Ca^{2+} -Imaging-Experimente durchgeführt. Bei letzterem wurden einerseits die isolierten Zellen, wie sensorische Neurone selbst untersucht, oder durch Zuhilfenahme von mAChR3-Reporterzellen Zellüberstände auf freigesetztes ACh untersucht. Zur weiteren Verifizierung wurden HPLC-Experimente durchgeführt.

2. Material und Methoden

2.1 Allgemein verwendete Materialien

Materialien, die speziell für die Durchführung einzelner Methoden verwendet wurden, werden gezielt dort aufgeführt. Material, welches bei verschiedenen Methoden benutzt wurde, ist im Folgenden aufgelistet.

Verbrauchsmaterial:

- Filtertips für Pipetten (versch. Volumina) [Greiner bio-one, Frickenhausen, D]
- Reaktionsgefäße (15 ml und 50 ml) [Greiner bio-one, Frickenhausen, D]
- Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1 ml, 2 ml) [Eppendorf, Wesseling-Berzd., D]
- Parafilm „M“ Laboratory Film [Pechiney Plastic Pack., Chicago]
- Nitrile white Handschuhe [u.a. B. Braun AG, Melsungen, D]
- SuperFrost Plus Objektträger [R. Langenbrick, Emmendingen, D]
- Objektträger [R. Langenbrick, Emmendingen, D]
- Deckgläser [R. Langenbrick, Emmendingen, D]

Glasware - Laborglas:

- Petrischalen [Duran Group GmbH, Wertheim, D]
- Messzylinder (versch. Volumina) [Duran Group GmbH, Wertheim, D]
- Standzylinder [Duran Group GmbH, Wertheim, D]
- Bechergläser [Duran Group GmbH, Wertheim, D]
- Standküvetten [Duran Group GmbH, Wertheim, D]
- Laborflaschen [Simax/Kavalierglas, CZ]

Geräte:

- Direct-Q™ Reinstwasseraufbereitungs-System [Millipore Cor., Billerica, USA]
- Pipetten (versch. Volumina) [Gilson, Middletom, USA]
- Magnetrührer RCT Basic und Rührfisch [IKA Labortechnik, Staufen, D]
- Waage MXX-612 [Denver instruments, NY, USA]
- Analysewaage R200D [Sartorius AG, Göttingen, D]
- Zentrifuge [Heraeus Sepatech, Hanau, D]
- Zentrifuge (Centrifuge 5424) [Eppendorf, Wesseling-Berzd., D]
- Vortexmischer MS2 Minishaker IKA [IKA Labortechnik, Staufen, D]
- pH-Meter Model 410 A [ThermoFisher, Massach., USA]
- Präparationsbesteck (Uhrmacherpinzette, Federschere, Knochenschere, Skalpellklinge) [F.S.T., Heidelberg, D]
- Präparationsmikroskop [Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, D]

Reagenzien/Substanzen:

- Ampuwa [Fresenius Kabi, Bad Homburg, D]
- Kollagenase [Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, D]
- Dispase II [Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D]
- Fetales Kälberserum [Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, D]
- Penicillin/Streptomycin (P/S) [Life Technologies GmbH, Darmstadt, D]

2.2 Versuchstiere und Tierhaltung

Für die Versuche wurden n=110 männliche und weibliche C57BL/6, B6.129-Trpv1tm1(cre)Bbm/J (TRPV1-*Cre*), B6.Cg-Tg(RP23-268L19-EGFP)2Mik/J (ChAT^{BAC}-eGFP), B6.Cg-Kit^{W-sh}/HNIhrJaeBsmGlliJ Mäuse und B6;129S6-*Gt(ROSA)26Sor^{tm9(CAG-tdTomato)Hze}*/J Mäuse, B6-Cg-Tg(Wnt1-*Cre*)11Rth Tg(Wnt1-GAL4)11Rth/J sowie deren Verpaarungen (TRPV1-*Cre*/tomato-flox), verwendet. Die Tiere waren im Mittel 15,78 Wochen alt (min.: 7 Wochen, max.: 89 Wochen) und 25,99 g (min.: 18,64 g, max.: 52,4 g) schwer.

Die Tiere entstammten der Zucht des Zentralen Tierlabors der Justus-Liebig-Universität Gießen. Gehalten wurden die Tiere unter standardisiertem Hell-Dunkel-Rhythmus von 14/10 Stunden. Alle Tiertötungen wurden in Übereinstimmung mit dem deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt und angezeigt (JLU-Nr. 556-Az, JLU-Nr. 557-Az, JLU-Nr. 572-M).

2.3 Tiertötung und Zellisolation

2.3.1 Tiertötung

Verwendete Substanzen:

- Isofluran (0,02-0,026 %) [Baxter, Unterschleißheim, D]

Zur schmerzfreien Tötung wurden die Versuchstiere in ein 1 l Glasgefäß gesetzt, in das zuvor ca. 0,2 ml Isofluran gegeben wurde. Das Tier schlief schnell ein und die Atmung setzte nach ein paar Minuten aus. Durch Druck am Fuß wurde die Areflexie getestet. Nach Eröffnung des Abdomens wurden die Aorta und Vena cava inferior durchtrennt und das Tier entblutet.

2.3.2 Präparation der Spinalganglien

Nach Eröffnen des Spinalkanals wurden die DRGs mit Hilfe eines Mikroskops einzeln entnommen. Die entnommenen DRGs wurden in 1-2 ml einer 2 mg/ml Kollagenase/Dispase-Lösung gegeben und auf Eis gestellt.

2.3.3 Präparation der JNC

Die sensorischen Ganglien des N. vagus, JNC, wurden von ventral präpariert. Verwendet wurden TRPV1-Cre/tomato-flox Mäuse, deren TRPV1⁺-Neurone anhand einer roten Fluoreszenz identifiziert werden konnten. Nach Entfernung des Fells wurde der Kopf der Maus überstreckt, der Meatus acusticus externus durchtrennt, Gl. submandibularis und Gl. parotis präpariert und die infrahyale Muskulatur, der M. digastricus und der M. sternocleidomastoideus entfernt. So wurde der N. vagus von kaudal im Foramen jugulare sichtbar. Der Proc. styloideus wurde entfernt und das Felsenbein disloziert. Die entnommenen JNCs wurden in 1-2 ml einer 2 mg/ml Kollagenase/Dispase-Lösung gegeben und auf Eis gestellt.

2.3.4 Präparation der parasymphatischen Ganglia pterygopalatina

Zur Präparation der parasymphatischen Ganglia pterygopalatina wurde das Versuchstier in Rückenlage fixiert und der Unterkiefer, die Zunge und die Zähne entfernt. Die Schleimhaut des Oberkiefers wurde abpräpariert. An der Schleimhaut wurde der N. palatinus major sichtbar. Die Foramina palatinae majores wurden eröffnet und die Nervenfasern bis in die Fossa pterygopalatina verfolgt, in der das Ganglion pterygopalatinum sichtbar wurde. Die entnommenen Ganglien wurden in 1-2 ml einer 2 mg/ml Kollagenase/Dispase-Lösung gegeben und auf Eis gestellt.

2.3.5 Isolation des Atemwegsepithels

Verwendete Substanzen

- | | |
|---|--|
| • Natriumchlorid (NaCl) | [Sigma-Aldrich, Steinheim, D] |
| • Kaliumchlorid (KCl) | [Merck KGaA, Darmstadt, D] |
| • Magnesiumchlorid (MgCl ₂) | [Merck KGaA, Darmstadt, D] |
| • HEPES | [Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D] |
| • Glukose | [Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, D] |
| • Calciumchlorid-Dihydrat | [Merck KGaA, Darmstadt, D] |
| • Natriumpyruvat | [Life Technologies GmbH, Darmstadt, D] |
| • Benztraubensäure | [Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, D] |

Tyrode I

140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 10 mM Glukose, 1 mM Natriumpyruvat

Tyrode II

140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, 10 mM Glukose, 1 mM Benztraubensäure

Dissoziationslösung:

- 2 mg/ml Papain (-20 °C) [Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, D]
- 25 µl L-Cystein (+4 °C) [Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, D]
- 0,5 µl DNase I (200 U/µl) (-20 °C) [Invitrogen, Carlsbad, USA]
- 4 µl EDTA (1 mM) (-20 °C) [SERVA Electroph. GmbH, Heidelberg, D]
aufgefüllt auf 1 ml mit Tyrode I

- 2 µl Leupeptin (5 mg/ml) [Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, D]
- 140 µl Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) [Life Technologies GmbH, Darmstadt, D]
- 1 ml Tyrode II

Zunächst wurde die Trachea freipräpariert und das umliegende Bindegewebe, Muskulatur und kleine Gefäße entfernt. Die Trachea wurde entnommen, in kleine Ringe geschnitten und diese in die auf Eis gestellte Dissoziationslösung gegeben.

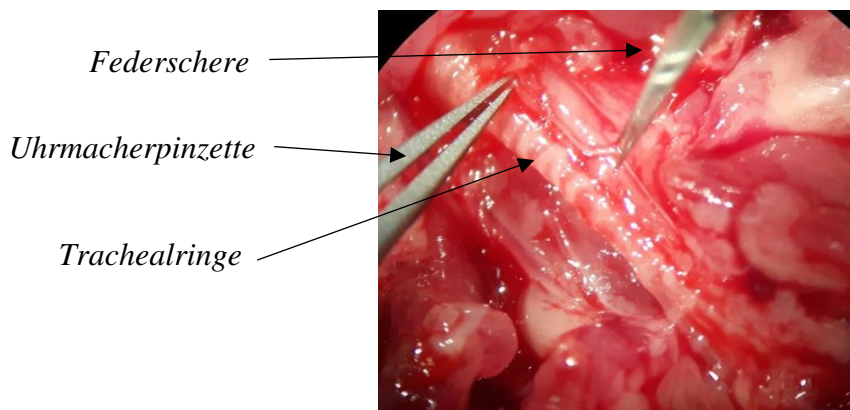


Abb. 2-1: **Präparation der Trachea.**

Umlegendes Bindegewebe, Nerven und Muskulatur wurden mit Pinzette und Schere entfernt.

Das Reaktionsgefäß wurde im Wasserbad bei 37 °C für 40 min inkubiert und die darin befindlichen Trachealstücke alle 10 min mit einer Pipette mechanisch dissoziiert. Nach 40 min wurde der Überstand abgenommen und die verbliebenen Knorpelspangen verworfen. Die Lösung wurde für 5 min mit 44 G (500 U/min) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1 ml Tyrode II mit 2 µl Leupeptin gelöst und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde erneut für 5 min mit 44 G (500 U/min) zentrifugiert und anschließend das Zellpellet in HBSS gelöst und auf beschichtete Deckgläschen (s. Kapitel 2.5.4) verteilt.

Als zusätzliche Methode zur Stimulation und Untersuchung von Atemwegsepithel wurde die Trachea präpariert und von umliegendem Gewebe befreit (Abb. 2-1). Anschließend wurde diese entnommen, longitudinal aufgeschnitten und komplett in ein Reaktionsgefäß gegeben. Die weitere Stimulation wird in Kapitel 2.4.7 beschrieben.

2.3.6 Isolation von Alveolarmakrophagen

2.3.6.1 Bronchoalveoläre Lavage (BAL)

- Vasofix Braunüle 1,3 x 45 mm (18 G) [B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D]
- Neubauer Improved Zählkammer [Laboroptik, Friedrichsdorf, D]

In Anschluss an Kap. 2.3.1 wurde die Trachea des auf dem Rücken fixierten Tieres von umliegendem Gewebe befreit und mit einer grünen Vasofix Braunüle 1,3 x 45 mm (18 G) punktiert. Durch diesen Zugang wurden 2 x 0,8 ml steriles PBS infiltriert, anschließend zurückgewonnen und in ein 15 ml Greiner-Röhrchen gegeben. Die anschließende Zellzahl-Bestimmung erfolgte mit der Neubauer-Zählkammer.

2.3.6.2 Zytospot

- Shandan Cytospin 3 Zytozentrifuge [ThermoFisher, Massachusetts, USA]

Die Zellsuspension wurde zentrifugiert und das Pellet auf eine Zellkonzentration von 10^6 Zellen/ml Medium in PBS eingestellt. Auf jeden Objektträger wurden nun 100 μ l Suspension mit Hilfe einer Zytozentrifuge zentrifugiert (800 U/min für 4 min) und getrocknet.

2.3.6.3 Pappenheimfärbung

Verwendete Lösungen:

- May-Grünwald-Lösung [Merck KGaA, Darmstadt, D]
- Giemsa [Merck KGaA, Darmstadt, D]
- PBS [Life Technologies GmbH, Darmstadt, D]

Die Zytospot-Präparate wurden für 5 min in May-Grünwald-Lösung gegeben und anschließend mit PBS für 2 min gewaschen. Für 15-18 min wurden die Zellen mit Giemsa (1:20 verdünnt) bedeckt. Im Anschluss wurden die Objektträger mit Aqua dest. gespült.

2.4 Zellkultur

Verwendete Materialien:

- Serological pipette, steril CELLSTAR [Greiner bio-one, Frickenhausen, D]
- Pipetboy accu-jet pro [Brand, Wertheim, D]
- Nunc EasYFlask, Nuclon Delta Surface [Thermo Scientific, Denmark]
- Plastikware (Becher versch. Volumina) [VITLAB GmbH, Grossostheim, D]
- Leica DM IRB [Leica Camera AG, Wetzlar, D]
- FreezerCell™ [Crystal Technology & Industries Europe GmbH, Hamburg, D]

2.4.1 Allgemeines Passagieren und Einfrieren von Zellen

Zur Entfernung toter Zellen wurden die bewachsenen Zellkulturflaschen, unabhängig von der Zellpopulation, zuerst mit sterilem PBS abgespült. Nachdem die toten Zellen abgenommen wurden, wurden die Zellen mit 0,03-0,06 ml/cm² Trypsin bedeckt und je nach Zelldichte für 2-5 min inkubiert. Anschließend wurde der Zellrasen im Mikroskop betrachtet und letzte festsitzende Zellen durch leichtes Schütteln gelöst. Die Zellsuspension wurde abgenommen und das doppelte Volumen an Zellkulturmedium hinzugegeben. Die Lösung wurde 5 min bei 179 G (1000 U/min) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in frischem Medium resuspendiert und erneut zentrifugiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

Um die Zellen zu passagieren, wurden je 5-10 x 10⁵ Zellen auf eine neue Flasche transferiert und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Alle 2-4 Tage wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Überschüssige Zellen wurden in Aliquots à 10⁶ Zellen in entsprechendem Zellkulturmedium und 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) eingefroren. Zum schonenden Einfrieren wurden Einfrierhilfen (FreezerCell™) verwendet. Die Zellen wurden bei -80°C gelagert.

2.4.2 Reporterzellen

Verwendete Zellkultur:

- M3WT4 (*chinese hamster ovary*) [American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, USA]

Verwendetes Material:

- F-12K Nutrient Mixture (1x) [Life Technologies GmbH, Darmstadt, D]

Zum Nachweis von ACh in Überständen von isolierten Zellen oder Medien aus dem Organbad wurden M3WT4-Zellen verwendet. Diese Zellpopulation entstand durch Transfektion von CHO-K1 Zellen mit einem pSVL Expressionsvektor mit dem Gen für

den mAChR3 (ATCC 2018). Für die Calciumimaging-Versuche wurden ca. 10^4 Reporterzellen in 20 μ l F-12K Nutrient Mixture auf 12 mm runde Deckgläschen ausgesät. Die Methode wird unter Kapitel 2.5 erklärt. Im Rahmen von Vorversuchen und Co-Kultivierungen von Neuronen mit Reporterzellen wurden die Reporterzellen für 24 h analog zu dissoziierten Neuronen in L-15⁺-Medium inkubiert.

2.4.3 Fibroblasten

Verwendete Zellkultur:

- MC3T3-E1 (ACC 210) [DSMZ – German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH, Braunschweig, D]

Verwendete Substanzen:

- DMEM (1x) [Life Technologies GmbH, Darmstadt, D]
- Fetales Kälberserum (FCS) [Sigma-Aldrich, Steinheim, D]
- Penicillin/Streptomycin (P/S) [Life Technologies GmbH, Darmstadt, D]

Eine Fibroblasten-Zelllinie (murine MC3T3-Zellen) wurden wie oben beschrieben in Kultur genommen und für Versuche verwendet. Das Kulturmedium war DMEM mit 10 % FCS und 1 % P/S.

2.4.4 L-15⁺-Medium

- Leibovitz's L-15-Medium (1x) [Life Technologies GmbH, Darmstadt, D]

Zum Kultivieren der Neuronen und Reporterzellen wurde L-15⁺-Medium verwendet. L-15-Medium wurde mit 10 % hitzeinaktiviertem fetalen Kälberserum (zuvor für 30 min bei 56 °C im Wasserbad hitzeinaktiviert) und 1 % Penicillin/Streptomycin versehen. Im Folgenden wird dieses als L-15⁺-Medium bezeichnet.

2.4.5 Dissoziieren von Neuronen

Das entnommene Gewebe (Kapitel 2.3.2 - 2.3.4) wurde in ein Reaktionsgefäß mit 1-2 ml Kollagenase und Dispase II (je 2 mg/ml) gelöst in HBSS gegeben. Die entnommenen Ganglien wurden für 60 min bei 37 °C inkubiert. Nach 30 min, 45 min und am Ende der 60 min wurde die Suspension mithilfe von Glaspipetten mit kleiner werdenden Durchmessern mechanisch dissoziiert.

Die Zellsuspension wurde anschließend 3 x in L-15⁺ Medium gewaschen und für je 3 min bei 179 G (1000 U/min) zentrifugiert. Das Pellet wurde resuspendiert, ca. 10-20 μ l auf

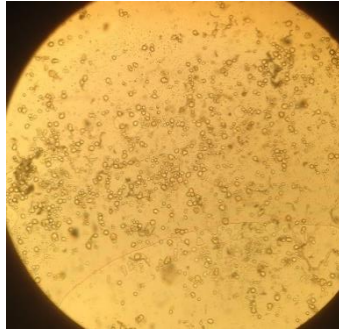


Abb. 2-2: **Dissoziierte und isolierte Spinalganglienzellen.**
(10fache Objektivvergrößerung, abfotografiert), ausgesät auf einem beschichteten Deckgläschen.

die Deckgläschen aufgetragen und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde L-15⁺ Medium hinzugegeben und erneut für 1 h (Zellpicken) bzw. bis zu 24 h (Calciumimaging) bei 37 °C inkubiert.

2.4.6 Locke-Puffer

Zur Herstellung von einem Liter Locke-Puffer wurden 136 mM NaCl, 5,6 mM KCl, 1,1 mM NaH₂PO₄ x 2 H₂O, 14,3 mM NaHCO₃, 1,2 mM MgCl₂ und 10 mM Glucose in 1 l destilliertem Wasser gelöst. Nach 30-minütiger Sauerstoff-Begasung wurden 2,2 mM CaCl₂ x 2 H₂O zugefügt.

2.4.7 Zellüberstände

Verwendete Substanzen:

- Eserin [Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, D]
- f-MKKFRW [zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Bernd Bufe, Kaiserslautern, D]

Zum Nachweis einer ACh-Freisetzung wurden isolierte Zellen (dissoziierte Neurone aus JNC, DRG und parasympathische Neurone) auf 12 mm runden Deckgläschen ausgesät. Das Medium wurde abgenommen und Locke-Puffer mit 10⁻⁵ M Eserin, einem unselektiven Blocker der AChE und BChE, hinzugegeben. Die Zellkulturplatte wurde für 10 min bei 37 °C inkubiert, die Lösung in ein Reaktionsgefäß überführt, dieses in flüssigem Stickstoff eingefroren und entweder bei -80 °C gelagert oder alternativ direkt auf Reporterzellen gegeben.

Bakterielle Substanzen sind in der Lage, eine ACh-Freisetzung aus dem Epithel zu provozieren. Zur Stimulation einer ACh-Freisetzung in Atemwegsepithel wurden wie in Kapitel 2.3.5 beschrieben Tracheen präpariert, entfernt und der Länge nach aufgeschnitten. Anschließend wurden 10 µM Eserin und (nach Entnahme einer

Kontrollprobe) 10 μM f-MKKFRW hinzugegeben. f-MKKFRW ist ein bakterielles Peptide, welches den Formyl Peptid Rezeptor (FPR) 3 aktiviert. FPR sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren und funktionieren als Chemorezeptoren des angeborenen Immunsystems (Bufe et al. 2015; Bufo et al. 2019). Nach 10 min wurde der Überstand entnommen.

2.5 Calciumimaging

Verwendetes Material:

- Mikroskop Leica Dm5000B [Leica Camera AG, Wetzlar, D]
- Wärmebad Isotemp 202S [ThermoFisher, Massachusetts, USA]
- Objektträgerheizung Biotechs Delta T5 [Biotechs Inc., Butler, PA 16002, USA]
- Umwälzpumpe Ismatec [Cole-Parmer GmbH, Wertheim, D]
- Fluoreszenz X-Cite 200DC [Excelitas Technologies, Wiesbaden, D]
- Software LAS X [Leica Camera AG, Wetzlar, D]
- Multiwellplatten Cellstar 12er/ 24er [Greiner bio-one, Frickenhausen, D]
- Deckgläschen, rund (12/18 mm) [R.Langensbrinck, Emmendingen, D]
- Delta T Dish 0,17 mm (clear) [Biotechs Inc., Butler, PA 16002, USA]
- Kamera [Hamamatsu Digital Camera C11440 Orca-Flash 4.0, Herrsching am Ammersee, D]
- Mikromanipulator [Phyton, Gröbenzell, D]

Verwendete Substanzen:

- Fura-2 AM [Life Technologies GmbH, Darmstadt, D]
- DMSO [SERVA Electrophoresis Heidelberg, D]
- Muskarinchloridhydrat [Sigma-Aldrich, Steinheim, D]
- Natriumchlorid (NaCl) [Sigma-Aldrich, Steinheim, D]
- Kaliumchlorid (KCl) [Merck KGaA, Darmstadt, D]
- Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) [Merck KGaA, Darmstadt, D]
- Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3) [Merck KGaA, Darmstadt, D]
- Magnesiumchlorid (MgCl_2) [Merck KGaA, Darmstadt, D]
- D-Glukose-Dextrose [Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, D]
- Calciumchlorid-Dihydrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) [Merck KGaA, Darmstadt, D]
- Sauerstoff [Linde GmbH, Pullach, D]
- Leibovitz's L-15 Medium (Phenolrot) [Life Technologies GmbH, Darmstadt, D]
- Poly-L-Lysin (0,1%) [Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, D]
- Laminin Mouse Protein (0,5 mg/ml) [Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, D]

- HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) [Life Technologies GmbH, Darmstadt, D]
- Eserin [Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, D]
- CPS [Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, D]
- Aceton [Merck KGaA, Darmstadt, D]
- Ethanol [Klinikapotheke des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH (UKGM), Gießen, D]
- Aqua dest. [Direct-Q™ Reinstwasseraufbereitungs-System (Millipore Cor., Billerica, USA)]

Vor Gebrauch der Deckgläschen wurden sie mit Aceton, Ethanol und Aqua dest. jeweils für 10 min gewaschen und bei 180°C gebacken. Anschließend wurden die Deckgläschen mit Laminin (0,005 mg/ml) und Poly-L-Lysin (0,05%), ca. 150 µl pro Gläschen, beschichtet. Nach Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer wurden die Deckgläschen 3 x mit Aqua dest. gewaschen. Nach Trocknung der Deckgläschen wurden diese bei Raumtemperatur gelagert. Für das Calciumimaging wurden die zu untersuchenden Zellen (z.B. Reporterzellen) auf beschichtete 12 mm runde Deckgläschen ausgesät. Die Zellen wurden in einer feuchten Kammer bei 37 °C inkubiert. 30-60 min vor Versuchsbeginn wurden die Zellen mit 4 µM Fura-2 AM in Zellkulturmedium inkubiert. Die Zellen wurden dadurch mit Fura-2 AM beladen und ein intrazellulärer Ca²⁺-Konzentrationsanstieg anschließend visualisierbar.

Das Deckgläschen wurde in eine Kammer gelegt und die Zellen mit Locke-Puffer umspült. Nachdem mit dem 20-fach Eintauchobjektiv ein Bereich gewählt wurde, der viele einzelne nicht deformierte Zellen enthielt, wurde die Aufnahme gestartet. Je nach Protokoll wurden verschiedene Substanzen nacheinander appliziert und der [Ca²⁺]_i-Anstieg mittels Fura-2 AM als Ca²⁺-Indikator gemessen. Entsprechend des Protokolls wurden die Stimuli (meist ein Volumen von 500 µl) zügig (innerhalb von 1-2 s) in die Kammer pipettiert.

Um höhere Konzentration des Stimulus direkt an den Zellen zu erreichen, wurde alternativ mit einer 100 µl-Spritze ein Volumen von ca. 100 µl Stimulus mit einer langen Kanüle nah an die Zellen appliziert.

Zur Verbesserung dieses Applikationsschritts wurde mit Hilfe eines Mikromanipulators eine Applikationsnadel nahe an das Eintauchobjektiv und die Zellen gebracht. Dadurch wurde jede Applikation an reproduzierbar gleicher Stelle ausgeführt.

Um die Konzentration des jeweiligen Stimulus an den Zellen zu erhöhen, wurde eine Kammer mit Subkutaninjektionsnadeln ausgestattet, siehe Abb. 2.3. Das Deckgläschen wurde direkt unter die Nadelspitzen platziert. Die Substanzen konnten so näher an die Zellen appliziert werden.

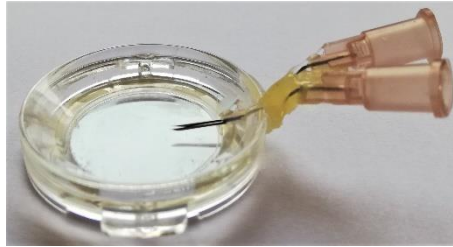


Abb. 2-3: Messkammer für Ca^{2+} -Imaging-Experimente.

Mit Subkutaninjektionsnadeln präparierte Kammer zur gezielteren Applikation kleinerer Volumina auf Zellen.

2.5.1 Bestimmung der Zellgröße

Zur Bestimmung der Zellgröße wurden die Zellkörper mit dem in der Software LAS X vorhanden Lineal ausgemessen (Abb. 2-4). Dazu wurden die Markierungen am größtmöglich sichtbaren Zelldurchmesser außen an der Zelle angesetzt und die Länge bestimmt.

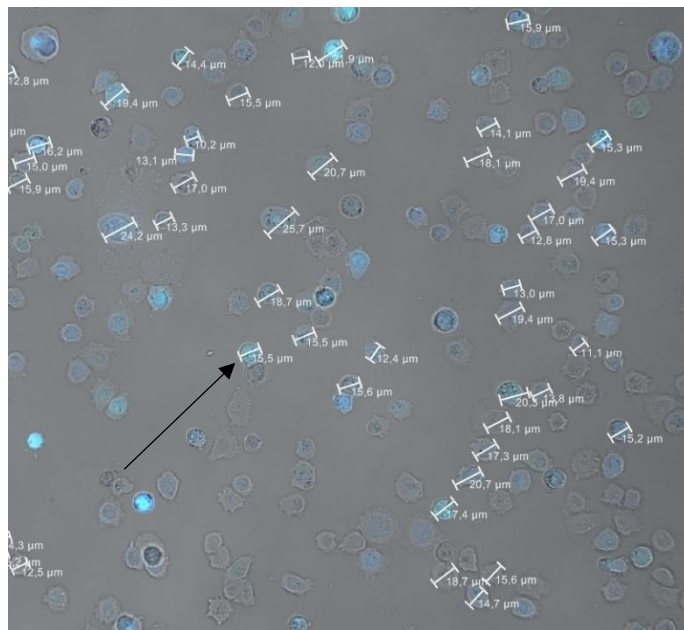


Abb. 2-4: Bestimmung der Zellgröße am Beispiel von mACHR3-Reporterzellen

Dargestellt sind mit Fura-2 beladene mACHR3-Reporterzellen. Die Zellen wurden am größten sichtbaren Zelldurchmesser mit dem Lineal der LAS X-Software ausgemessen. Pfeil: ausgemessene (15,5 µm), beladene Reporterzelle.

2.5.2 Auswertung Calciumimaging

Mit dem Start der Software von LAS X (Leica Camera AG, Wetzlar, D) wurden die entsprechenden Filter ausgewählt. Je nach Versuch wurden der Durchlicht-Filter und Filter mit einer Anregungswellenlänge von 340 nm, 380 nm und bei Messungen von isolierten Zellen von TRPV1-Cre/tomato-flox Mäusen ebenfalls ein Filter mit einer Anregungswellenlänge von 581 nm ausgewählt. Anschließend wurden die Auflösung, die Belichtungszeit und die Intensität eingestellt. Unter Durchlicht wurde der entsprechende Messausschnitt auf dem Deckgläschen ausgewählt und festgehalten. Nun wurden die *Regions of interest (ROIs)* gewählt und die zu messenden Zellen markiert. Anschließend wurden die für die folgende Messung nicht notwendigen Filter deaktiviert, sodass ausschließlich mittels 340 und 380 nm Filter angeregt wurde. Abschließend wurde das Zeitintervall auf 1 Sekunde gestellt und die Messung gestartet. Mit Abschluss der Messung wurden die Daten in Microsoft Excel importiert. Während eines 120 s dauernden Messintervalls wurden pro Sekunde 2 Bilder bei einer Anregungswellenlänge von 340 nm und 380 nm erstellt. Bei Sekunde 60 wurde das jeweilige Stimulanz hinzugegeben (Abb. 2-5), sodass 60 Bilder je Anregungswellenlänge vor und nach Stimulation aufgezeichnet wurden. Somit konnte für jede Zelle und jedes Bildpaar eine Ratio der Messwerte gebildet werden.

Die Reaktion einer Zelle auf eine Stimulation wurde als positiv gewertet, wenn der maximale Anstieg nach Stimulation innerhalb von 15 s mindestens 10 % betrug. Zellen, die bereits auf den Negativkontrollstimulus (Vehikel, z.B. Puffer) reagierten, sowie Zellen, die auf die Positivkontrolle (Capsaicin (CPS) für TRPV1⁺-Neurone oder Muskarin und ACh für Reporterzellen) nicht reagierten, wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Alle Daten wurden zur Verarbeitung in Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, USA) importiert. Die grafische Darstellung und Statistik erfolgte mit Graph Pad Prism 7 (GraphPad Software, San Diego, CA 92108).

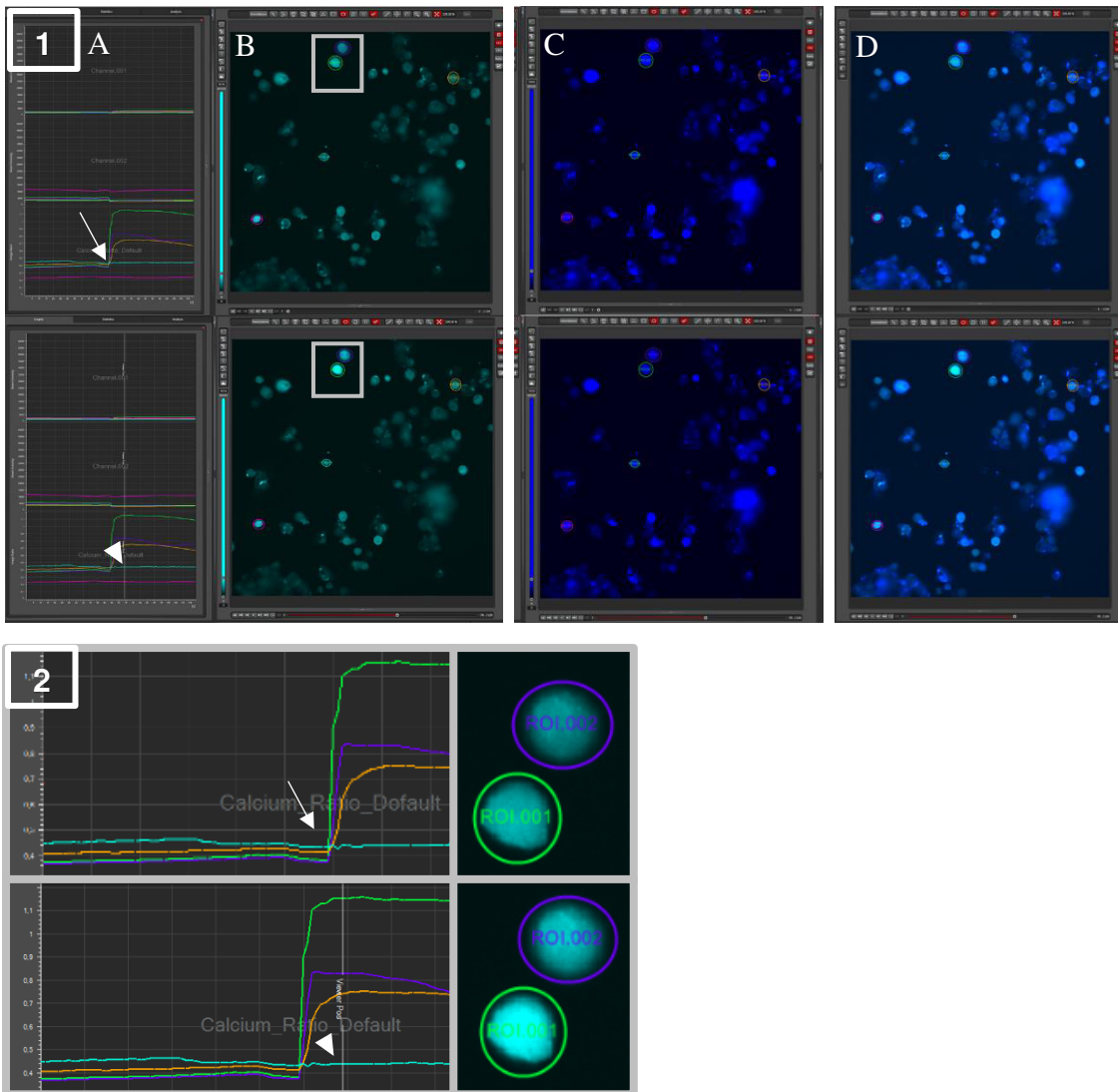


Abb. 2-5: Bildausschnitt während einer Ca^{2+} -Imaging Messung

LAS X Software **1**: kompletter Screenshot, **2**: Vergrößerung aus Abschnitt A + B
A: Zeitachse mit Intensitätsveränderung, **B**: Kanal 1 (340 nm), **C**: Kanal 2 (380 nm) und **D**: 340/380-Ratio. Markiert wurden Neurone eines JNC, stimuliert wurde bei 60 s mit 300 nM Capsaicin. Sichtbar ist eine Intensitätsveränderung nach Stimulation: **oben** bei Beginn, **unten** dieselben Zellen 10 s nach Stimulation. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Stimulation. Die Pfeilspitze markiert den Zeitpunkt ca. 10 s nach Stimulation.

2.6 cDNA-Synthese isolierter Zellen

verwendete Materialien:

- Zeiss Axioskop Mikroskop [Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, D]
- Mikromanipulator [Phytron, Gröbenzell, D]
- Pumpe Minipuls 2 [Gilson, Middletom, USA]
- Flaming/Brown Micropipette Puller Model P-97 [Science Products GmbH, Hofheim, D]
- Glaskapillare GB150F-10 [Science Products, Hofheim, D]
- 100 µl gasdichte Glaspritze [Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, CH]
- RNase Out (40U/µl) [Invitrogen, Carlsbad, USA]
- Kammer [Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, D]

Um einzelne Zellen auf mRNA für CTLs, CHT1 und ChAT zu untersuchen, wurden diese mittels Zellpicken isoliert.

Für das Zellpicken wurden die Kapillaren zuvor mit dem Flaming/Brown Micropipette Puller Model P-97 gezogen. Die Öffnung war meist etwas größer als die zu pickenden Neurone. Die mittels Mikromanipulator gesteuerte Glaskapillare war zwischen Objektiv und Deckgläschen frei beweglich. Das Deckgläschen mit den ausgesäten Zellen wurde in eine Kammer eingespannt und perfundiert.

Das Picken der Zellen erfolgte in einem Zeitfenster von 3-6 h nach Aussaat der Neurone (JNC/DRG von TRPV1-Cre/tomato-flox Mäusen)/Zellen auf dem Deckgläschen. Das Eintauchobjektiv wurde in das Medium gebracht. Die Glaskapillare wurde mittels Joystick des Mikromanipulators bewegt und positioniert. Durch Wechsel des Filters konnten leuchtende (TRPV1-positive) oder nicht leuchtende (TRPV1-negative) Zellen ausgewählt werden (vgl. Abb. 3-4). Durch leichten Unterdruck wurde die Zelle in die Glaskapillare gezogen und deren Spitze, die die Zelle beinhaltet, in ein vorbereitetes Reaktionsgefäß gegeben. In dem Reaktionsgefäß befand sich 1 µl eines RNase-Inhibitors (RNaseOut). Bis zur Umschreibung wurden die Zellen bei -20 °C gelagert.

2.6.1 Reverse Transkription von Einzelzellen

verwendete Geräte:

- Mastercycler Personal [Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, D]

verwendete Chemikalien:

- Resuspension Buffer
 - DNase I (1 U/μl)
 - 10x DNase I Puffer
 - 25 mM EDTA
 - Oligo(dT)₂₀ (50 μM)
 - SSIII (200 U/μl)
 - 10 mM dNTP Mix
 - 5x RT Puffer
(250 mM Tris-HCL,
375 mM KCL,
15 mM MgCl₂)
 - RNase Out (40 U/μl)
 - 0,1 M Dithiothreitol (DTT)
 - Random Hexamers [Invitrogen, Carlsbad, USA]
 - Ampuwa [Fresenius Kabi, Bad Homburg, D]
- SuperScript III CellsDirect cDNA Synthesis System
[Invitrogen, Carlsbad, USA]

Für das Umschreiben der RNA in cDNA wurden Reagenzien aus dem SuperScript III Kit von Invitrogen verwendet. In das 0,2 ml PCR Reaktionsgefäß, in dem sich 1 μl RNaseOut und eine gepickte Zelle befanden, wurden 10 μl Resuspensionspuffer gegeben und für 10 min bei 75 °C inkubiert. Dadurch wurde die Membran der Zelle zerstört und die enthaltene RNA frei. Anschließend wurde kurz zentrifugiert, 5 μl DNase I und 1,6 μl 10x DNase I Buffer wurden hinzugegeben und der Ansatz für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der DNase-Verdau wurde durch Zugabe von 1,2 μl EDTA gestoppt und das Gemisch für 5 min bei 70 °C inkubiert. Nach Applikation von je 1 μl Oligo(dT)₂₀, Random Primer (Roche) und 10 mM dNTP Mix folgte erneut eine Inkubation bei 70 °C für 5 min. Nun wurde für die -RT-Kontrolle 3,5 μl abgenommen und in ein weiteres Reaktionsgefäß überführt.

Pro Zelle wurde ein Mastermix aus 6 μl 5x RT Puffer, 1 μl RNaseOut und 1 μl 0,1 M DTT erstellt. Ein Sechstel des Mixes wurde in ein anderes Reaktionsgefäß überführt. Zu den übrigen 5/6 wurden 0,83 μl SuperScript III RT gegeben. Zu den 1/6 Mastermix wurden 1 μl H₂O pro -RT (statt der SSIII) hinzugegeben. Das Endvolumen der cDNA-Ansätze betrug 25 μl und das Volumen der -RT-Kontrolle 5 μl. Nach Vortexen und Zentrifugieren wurden die Proben für 50 min bei 50 °C inkubiert und die Reaktion anschließend für 5 min bei 85 °C beendet. Die entstandene cDNA und -RT wurde bei -20 °C gelagert.

2.6.2 Durchführung der *single-cell*-RT-PCR

Verwendetes Material und Geräte:

- Mastercycler Gradient [Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, D]
- PCR Tube Strips 0,2 mL [Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, D]
- HotStarTaq Polymerase Kit [Qiagen GmbH, Hilden, D]

Pro Probe und Primer wurden 2 µl 10x Puffer, 0,8 µl MgCl₂, 0,4 µl dNTPs, 0,125 µl Taq-Polymerase und 13,7 µl Aqua dest. zusammengegeben. Je 2 µl Primermix, bestehend aus je 10⁻⁵ M *forward*- und *reverse* Primer, wurden angesetzt. Zu den 2 µl Primermix wurden 17 µl Mastermix und 1 µl cDNA gegeben. Zur Amplifizierung der cDNA wurden 50 Zyklen verwendet. Dazu wurde folgendes Mastercycler-Programm benutzt:

Schritt 1	Temperatur: 95 °C für 10 min
Schritt 2 (Denaturieren)	Temperatur: 94 °C für 30 s
Schritt 3 (Annealing)	Temperatur: 60 °C für 30 s
Schritt 4 (Elongation)	Temperatur: 72 °C für 1 min
(Wiederholung von Schritt 2-4 49x)	
Schritt 5	Temperatur: 72 °C für 10 min

2.7 RNA-Isolierung aus Gesamtgeweben und Umschreibung

Verwendetes Material und Geräte:

- Kugelmühle Retsch MM300 [Retsch GmbH, Haan, D]
 - RLT Lysis Puffer
 - RPE-Puffer
 - RW1 Waschpuffer
 - RNeasy Mini Spinsäule
 - Nanodrop 2000 [ThermoFisher, Massachusetts, USA]
 - Mastercycler Personal [Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, D]
 - PCR Tube Strips 0,2 ml [Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, D]
- } *RNeasy Mini Kit*
[Qiagen GmbH, Hilden, D]

Die RNA-Isolierung erfolgte mittels RNeasy Mini Kit. Die Homogenisierung isolierten Zellmaterials erfolgte mittels Kugelmühle für 3 min bei 30 Schlägen/min. Im Folgenden wurden 600 µl 70%-iger EtOH hinzugegeben und vorsichtig auf- und abpipettiert. 700 µl dieser Lösung wurden in eine RNeasy Mini Spinsäule gegeben und für 1 min mit 9520 G (10000 U/min) zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und der Schritt wiederholt. Im Folgenden wurden erst 700 µl RW1 Waschpuffer auf die Säule gegeben und 1 min mit 9520 G (10000 U/min) zentrifugiert, dann 500 µl RPE Puffer und im Anschluss mit 500 µl RPE Puffer für 2 min mit > 16089 G (14680 U/min) zentrifugiert. Für 1 min wurde die Säule trocken zentrifugiert. 30 µl Aqua dest. wurden auf die Säule gegeben und

1 min mit 9520 G (10000 U/min) zentrifugiert. Der Durchfluss enthielt die isolierte RNA und wurde auf Eis gelegt.

Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte mittels Nanodrop 2000, einem Mikrovolumensystem. Mittels des Spektralphotometers wurden die Proben mit einem Volumen von 1 µl gemessen und die Werte in ng/µl dargestellt.

Bei der Umschreibung wurde zuerst ggf. vorhandene genomische DNA verdaut. Hierfür wurden 2 µl DNase, 2 µl DNase Puffer, 2 µg cDNA und 16 µl H₂O zusammengegeben und für 15 min bei 25 °C inkubiert. Anschließend wurden 2 µl EDTA-Lösung hinzugegeben und für 10 min bei 65 °C inkubiert, um die Reaktion zu stoppen. Der Mastermix für das Umschreiben setzte sich zusammen aus 8 µl 5x First Strand Puffer, 2 µl DTT (0,1 M), 1 µl dNTPs (10 mM), 0,5 µl Oligo dT (50 µM) und 0,5 µl Hexamer Primer (50 ng/µl). Im Folgenden wurde der Mastermix auf je ein Reaktionsgefäß für die -RT und eines für die SuperScript II aufgeteilt. Pro Probe wurden 2 µl SSC II (200 U/µl) hinzugegeben. Im Reaktionsgefäß für die -RT wurde anstelle der Reversen Transkriptase H₂O hinzugefügt. Zum Schluss wurden die Proben für 50 min bei 42 °C und final für 10 min bei 72 °C inkubiert.

2.7.1 RT-PCR

Verwendetes Material und Geräte:

- Mastercycler Gradient [Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, D]
- PCR Tube Strips 0,2 mL [Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, D]
- HotStarTaq Polymerase Kit [Qiagen GmbH, Hilden, D]

Pro Reaktion und Primer wurden 2 µl 10x Puffer, 0,8 µl MgCl₂, 0,4 µl dNTPs, 0,125 µl Taq-Polymerase und 13,7 µl Aqua dest. zusammengegeben.

Der Primermix enthielt jeweils 10⁻⁵ M *forward*- und *reverse*-Primer, in Aqua dest. gelöst. Zu 17 µl Mastermix und 1 µl cDNA wurden 2 µl Primermix (Endkonzentration: 5 µM) gegeben.

Zur Amplifizierung der cDNA wurde 40 Zyklen (der Schritte 2-4) durchgeführt und folgendes Mastercycler-Programm verwendet:

Schritt 1	Temperatur: 95 °C für 10 min
Schritt 2 (Denaturieren)	Temperatur: 94 °C für 30 s
Schritt 3 (Annealing)	Temperatur: 60 °C für 30 s
Schritt 4 (Elongation)	Temperatur: 72 °C für 1 min
(Wiederholung von Schritt 2-4 39x)	
Schritt 5	Temperatur: 72 °C für 10 min

2.7.3 Primer

Die Primer (Tabelle 1) wurden mit Hilfe von <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> gepickt und von Invitrogen [Carlsbad, USA] synthetisiert. Die Primer der mAChR waren nicht intron-spannend, da diese Gene keine Introns aufweisen. Alle weiteren Primer waren intron-spannend.

Gene	Primer	Sequenz (5' zu 3')	GenBank	PCR-Produkt
β-Aktin	Forward	CCATCATGAAGTGTGACGTTGA	NM_007393.3	249 bp
	Reverse	CATCGTACTCCTGCTTCTGAT		
TRPV1	Forward	GCTGCTAACGGGACTTCTT	NM_001001445.1	285 bp
	Reverse	CTTCAGTGTGGGGTGGAGTT		
CTL1 (Primerpaar 1)	Forward	TGGCATCAGTGAATCGCTT	NM_001159633	140 bp
	Reverse	TGCACAAGCGTTTTCTTCC		
CTL1 (Primerpaar 2)	Forward	CCAACTTCTGCACCTCAGCA	NM_133891	121 bp
	Reverse	CAGACTATCAGCACCTTGCC		
CTL2 (Primerpaar 1)	Forward	CTGCAACCCAGAGACCTTCC	NM_001199186 + NM_152808	126 bp
	Reverse	TTGAAAGATCTGCAGGCCAG		
CTL2 (Primerpaar 2)	Forward	CGCAGGAATGGGAAGGATT	NM_152808	178 bp
	Reverse	ATGGGTCCAGGCTATGATGC		
CTL 3	Forward	CTTCACATTCGCCCTGTCTCT	NM_145394	122 bp
	Reverse	ACCATAAGACACCCGACAGC		
CTL4	Forward	AATGAGAACGAGGCTCACGG	NM_023557	155 bp
	Reverse	CCATACACCCAGGCCACAAG		
CTL5	Forward	TACCTGGACGCCAGGAGGTA	NM_001081263	180 bp
	Reverse	ACAGTCAGGCCGATGAGAATC		
CHT1	Forward	AGCTGACTCGCTCATCCTGTC	AF276872	174 bp
	Reverse	AGCCCATACACAGTCTTCGTC		
ChAT	Forward	GACCAGCTAAGGTTTGCAGC	NM_009891.2	163 bp
	Reverse	CAGGAAGCCGGTATGATGAGA		
mAChR1	Forward	CAGTCCCAACATCACCGTCTT	NM_007698	441 bp
	Reverse	GAGAACGAAGGAAACCAACCAC		
mAChR2	Forward	TGTCTCCAGTCTAGTGCAAGG	NM_203491	369 bp
	Reverse	CATTCTGACCTGACGATCCAAC		
mAChR3	Forward	GTACAACCTCGCCTTTGTTTCC	NM_033269.4	245 bp
	Reverse	GACAAGGATGTTGCCGATGATG		
mAChR4	Forward	GCCTTCATCCTCACCTGGAC	NM_007699	156 bp
	Reverse	AGTGGCATTGCAGAGTGCAT		
mAChR4	Forward	CCGCCGCACTACTAAGATGGTCC	NM_007699	110 bp
	Reverse	TCTTGCCACCACAAAC		
mAChR5	Forward	CAGCGTCCCATGAGGATGTA	NM_205783	216 bp
	Reverse	CCATGGACTGTGGGAAGTCA		

Tabelle 1: Liste der verwendeten Primer

TRPV1 = transient receptor potential vanilloid 1; *CTL* = Choline transporter-like; *CHT* = high-affinity choline transporter; *ChAT* = Cholin Acetyltransferase; *mAChR* = muskarinische ACh-Rezeptor

2.8 Gelelektrophorese

Verwendete Materialien, Substanzen und Geräte:

- 1x TAE (s.u.)
- Biozym LE Agarose [Biozym, Oldendorf, D]
- Ethidiumbromid [Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D]
- Elektrophorese Kammern Model: 40-1214 [Peqlab, Erlangen, D]
- Kämme 20 WELL 1,0 mm [Peqlab, Erlangen, D]
- Orange G [Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, D]
- Thermo Scientific GeneRuler 100 bp DNA Ladder [ThermoFisher, Massachusetts, USA]
- Spannungsquelle PS 500 XT DC Power Supply [Hofer Scientific Instruments, San Francisco, USA]
- UV-Schirm, Kamera und Software [Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, D]

50x TAE (50-fache TRIS-Acetat-Ethylendiamidintetraessigsäure (EDTA))

- TRIS (C₄H₁₁NO₃ – M:121,14 g/mol) [Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D]
- Eisessig [Merck KGaA, Darmstadt, D]
- EDTA (0,5 M; pH: 8,0) [ThermoFisher, Massachusetts, USA]
- Aqua dest.

Um 1x TAE zu erhalten, wurde 50x TAE 1:50 mit Aqua dest. verdünnt.

Orange G

- 25 ml TAE 1x
- 25 ml Glycerol [Merck KGaA, Darmstadt, D]
- Orange G [Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, D]

Zu der 50 ml Lösung wurde Orange G-Pulver hinzugegeben, bis ein kräftiger Farbton erreicht wurde. Abgefüllt wurden Aliquots à 2 ml Orange G-Lösung. Diese wurden bei -20 °C aufbewahrt.

100-Basenpaarmarker

Thermo Scientific GeneRuler 100 bp DNA Ladder [ThermoFisher, Massachusetts, USA]

Die Länge der PCR-Produkte wurden mittels Gelelektrophorese bestimmt. Dazu wurde ein 2 %-iges Agarose Gel mit 1x TAE und Ethidiumbromid (200-500 µg/ml) verwendet. Zu der amplifizierten cDNA wurden 5 µl Orange G gegeben. Nach Aushärten des Gels wurde dieses mit 1x TAE umspült und je 5 µl der Proben in die Taschen gegeben. In die erste Tasche wurde ein 100 bp-Marker gegeben. Die Laufzeit betrug im Mittel 30 min bei 150 V. Im Anschluss wurde das Gel unter UV-Licht indirekt betrachtet. Entstandene Banden wurden mittels UV-Schirm sichtbar gemacht, fotografiert sowie digital gespeichert und die PCR-Produkte im Anschluss anhand der Bandenhöhe im Vergleich zum Basenpaarmarker bestimmt.

2.9 Organbad

Verwendete Geräte:

- Organbad [Radnoti LLC, Covina, USA]
- Elektrischer Feldstimulator [Radnoti LLC, Covina, USA]
- Organbad-Programm [ADInstruments Ltd, Oxford, UK]

HEPES-Puffer:

Verwendete Chemikalien:

- Kaliumchlorid [Merck KGaA, Darmstadt, D]
- Natriumchlorid [Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D]
- Glukose [Merck KGaA, Darmstadt, D]
- HEPES [Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D]
- Magnesiumchlorid-6-hydratlösung [Merck KGaA, Darmstadt, D]
- Calciumchlorid-2-hydratlösung [Merck KGaA, Darmstadt, D]
- NaOH [Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D]

Für das Organbad wurden die 5 kaudalen Trachealringe entnommen und in HEPES-Puffer gegeben. Die Trachealringe wurden mithilfe kleiner Haken, die mit einem Druckaufnehmer verbunden waren, in eine mit HEPES-Puffer gefüllte Kammer gehängt und mit Sauerstoff begast. Mithilfe der Software (Lab Chart 7 Pro) wurde zuerst jeder Druckaufnehmer kalibriert. Die Messungen wurden kontinuierlich aufgezeichnet und zur weiteren Analyse in Microsoft Excel importiert.

Das Experiment begann mit einer elektrischen Feldstimulation (EFS) (10 V, 150 mA für 2 ms, 10 Hz), bei der die Trachealringe 3x für 1 min stimuliert wurden. So wurde die Vitalität der Trachealringe überprüft. Zehn Minuten nach der dritten Stimulation wurde 10^{-5} M Eserin, ein Blocker für AChE und BChE, hinzugegeben. Nach 20 min wurde erneut eine EFS durchgeführt. Final wurde 10^{-6} M Muskarin auf die Tracheen gegeben.

2.9.1 Mastzell-defiziente Mäuse

Mastzell-defiziente B6.Cg-Kit^{W-sh}/HNihrJaeBsmGlliJ-Mäuse wurden uns freundlicherweise von Frank Petersen, Leibniz Forschungszentrum Borstel, zur Verfügung gestellt. Als Kontrollgruppe wurden B6-Cg-Tg(Wnt1-Cre)11Rth Tg(Wnt1-GAL4)11Rth/J-Mäuse verwendet.

Die Mastzell-defizienten B6.Cg-Kit^{W-sh}/HNihrJaeBsmGlliJ-Mäuse wurden in Borstel getötet und präpariert. Entnommen wurden die Trachea und das Thoraxpaket. Zeitgleich wurden durch Silke Wiegand den Kontrolltieren in Gießen die entsprechenden Organe entnommen und analog bei Raumtemperatur in HEPES-Puffer gelagert.

2.9.2 Inkubation von Trachealringen mit Botulinumtoxin Typ A

Verwendete Substanzen:

- Botulinumtoxin Typ A [Allergan, New Jersey, USA]

Die Tracheen wurden freipräpariert, entnommen und 5 Trachealringe abgetrennt. Diese wurden vor der Verwendung im Organbad 24 bzw. 48 h in HEPES-Puffer inkubiert und mit Sauerstoff begast. Der Puffer wurde mit 50 IE Botulinumtoxin Typ A versetzt. Zeitgleich wurden Tracheen identisch behandelt, jedoch ohne Applikation von Botulinumtoxin Typ A. Die Tracheen wurden anschließend nach oben beschriebenem Organbad-Protokoll (Kapitel 2.9) behandelt.

2.9.3 Überstände aus Organbadversuchen

Die Trachealringe wurden in das Organbad eingehängt und nach der Kalibrierung durch EFS stimuliert. Anschließend wurden 10^{-5} M Eserin hinzugegeben. Nach ca. 10 min wurden ca. 15 ml Medium, mit dem die Zellen umspült wurden, aus der Kammer entnommen und in ein 50 ml Greinerröhrchen gegeben. Aus diesem Medium wurden direkt 500 μ l Medium auf die Reporterzellen im Calcium-Imaging gegeben.

2.10 Histologische Färbungen

2.10.1 Gewebeentnahme, Gewebefixierung und Einfrieren

Für histologische Färbungen wurden im Anschluss an die beschriebene Tötung des Versuchstieres Abdomen und Thorax eröffnet. Zu untersuchendes Gewebe (Darm, Trachea, DRG und JNC) wurde zügig entnommen, von umgebendem Bindegewebe und Fett befreit und in Zamboni-Lösung fixiert.

Stammlösung A (0,2 M) für den Phosphatpuffer (PP):

- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ [Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D]

31,2 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ (Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat) wurden in 1000 ml Aqua dest gelöst und bei +4°C aufbewahrt.

Stammlösung B (0,2 M) für den PP:

- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ [Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D]

35,60 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ (Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat) wurden in 1000 ml Aqua dest gelöst und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) pH 7,4

- 28,75 ml Stammlösung A
- 96,20 ml Stammlösung B
- 22,4 g NaCl [Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D]
- Aqua dest.

0,2 M PP Puffer:

- 0,23 l Stammlösung A ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$)
- 0,77 l Stammlösung B ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$)
- Aqua dest.

Der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt.

Zamboni-Lösung:

- 15 % Pikrinsäure [Merck KGaA, Darmstadt, D]
- Formalinlösung (37 %) [Merck KGaA, Darmstadt, D]
- Aqua dest.

50 ml der 37 %-igen Formalinlösung wurden mit 500 ml 0,2 M PP Puffer (200 ml Stammlösung A und 300 ml Stammlösung B) und 150 ml Pikrinsäure (gesättigte Lösung, zweifach gefiltert) gemischt und mit Aqua dest. auf 1000 ml aufgefüllt.

18 % Saccharose-Lösung

- Saccharose [Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D]
- Aqua dest.

4 % Paraformaldehyd (PFA)

- Paraformaldehyd [Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D]

40 g Paraformaldehyd wurden in 500 ml Aqua dest. gelöst, auf 70 °C erhitzt und mit NaOH geklärt. Anschließend wurden 500 ml 0,2 M PP dazugegeben.

Das entnommene Gewebe wurde in Zamboni-Lösung bzw. 4 % PFA gegeben und für einige Stunden bzw. über Nacht, abhängig von der Gewebegröße im Fixativ, lichtgeschützt und vorsichtig bewegt, belassen. Anschließend wurde das Fixiermittel mit 0,1 M Phosphatpuffer wieder ausgewaschen und täglich mehrfach gewechselt. Nach mehreren Pufferwechseln war der Waschvorgang beendet und das Gewebe wurde vor dem Einfrieren über Nacht in 18 % Saccharose-Lösung gegeben.

2.10.2 Gewebeverarbeitung

Verwendetes Material:

- Tissue-Tek O.C.T. [Sakura Finetek Europe B.V., Aphen aan den Rijn, NL]
- 2-Methylbutan [Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D]
- Kryostat Leica CM 1900 [Leitz, Bensheim, D]
- SuperFrostPlus Objektträger [R. Langenbrinck Labor-/Medizintechnik, Emmendingen, D]
- Flüssiger Stickstoff [Linde GmbH, Pullach, D]

Nachdem das Gewebe über Nacht in Saccharose-Lösung lag, wurde es in eine Plastikschiene gefüllt, mit Tissue Tek gebettet und in ein Gefäß, das mit 2-Methylbutan gefüllt und von flüssigem Stickstoff umgeben war, vorsichtig eingetaucht. Der gefrorene Block wurde auf ein Filterpapier aufgebracht, in Paraform eingewickelt und bis zum Schneiden bei -20 °C eingefroren. Am Kryostaten wurden aus gefrorenen Gewebeblöcken ca. 10 µm dicke Schnitte erzeugt und auf Objektträger überführt.

2.10.3 Gewebeeinbettung in Paraffin

- Leica RM2255 (Rotationsmikrotom) [Leica Camera AG, Wetzlar, D]
- Tissue-TEK II Tissue Embedding Center [Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn, The Netherlands]
- Paraffin-Streckbank GFL 1052 [GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, D]

Nach erfolgter Fixierung des Gewebes (s. Kapitel 2.10.1) wurde das Gewebe in ein Plastikschielchen gegeben und je 2 Mal für 2 h in Alkohol gelegt. Beginnend mit 50 %-igem Ethanol (EtOH) wiederholten sich diese Schritte mit 70 % EtOH, 90 % EtOH,

96 % EtOH, 100 % EtOH und Xylol. Das Gewebe wurde nun in vorher erwärmtes Paraffin gegeben und über Nacht darin belassen. Mit Hilfe eines Ausblockautomaten wurde das Gewebe als Paraffinblock gegossen und erhärtete. Die Lagerung erfolgte über Nacht bei 4°C.

Am Mikrotom wurden einzelne ca. 5 µm dicken Schnitte erstellt und auf einen Objektträger aufgebracht. Über Nacht härteten die Schnitte bei Raumtemperatur aus.

2.10.4 Toluidinblau-Färbung

- Toluidinblau [Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D]

Um die Schnitte von Paraffin zu befreien, wurden sie in einen Schlitten für Objektträger gehängt und 2 x 5 min in Xylol und anschließend für einige Sekunden durch die absteigende Alkoholreihe (100 % EtOH, 96 % EtOH und 70 % EtOH) geführt und zu guter Letzt in Aqua dest. rehydriert.

Nach kurzem Abtropfen wurden ein paar Tropfen Toluidinblau (1 %ige Lösung) auf das Gewebe gegeben und für ein 3-5 min auf eine 60°C Wärmeplatte gelegt. Anschließend wurden die Schnitte mit einem Deckgläschen und einem Tropfen Sekundenkleber eingedeckelt. Die Zellkerne erschienen stark und das Zytoplasma schwach angefärbt. Die Färbung eignete sich gut zur schnellen Beurteilung vorhandener Zellen und deren Formen.

2.10.5 Immunhistochemische Färbung

Faulhammerblocklösung

- PBS pH 7,4 0,1M
- + 5% BSA (Bovine Serum Albumin) [Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, D]
- + 5% NGS (Normal Goat Serum) [Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, D]
- + 0,1% CWFS (Cold Water Fish Skin)-Gelatine [Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, D]

Mowiol

- 6 g Glycerol (analytical grade) [Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D]
- 2.4 g Mowiol [Merck KGaA, Darmstadt, D]
- 6 ml Dest Wasser [Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D]
- 12 ml 0.2 M TRIS Puffer pH 8

4 h rühren, anschließend 2 h ruhen lassen. Inkubation für 10 min bei 50° C im Wasserbad. Zentrifugieren (5000 G) für 15 min. Überstand dekantieren und in Aliquots bei -20° C einfrieren.

Die Kryo-Schnitte von B6.Cg-Tg(RP23-268L19-EGFP)2Mik/J (ChAT^{BAC}-eGFP)-Mäusen wurden auf den Objektträgern mit einem Fettstift umrandet und in eine feuchte Kammer gelegt. Anschließend wurden die Schnitte vollständig mit Faulhammerblocklösung bedeckt und 1 h lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Die Blocklösung wurde abgenommen, der Primärantikörper (Hühnchen anti-GFP (NB100-1614), Verdünnung 1:2000 [Bio-Techne GmbH, Wiesbaden, D]) aufgetragen und über Nacht lichtgeschützt bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Als Negativkontrolle wurde der Primärantikörper weggelassen. Am nächsten Tag wurde der Primärantikörper abgenommen und die Objektträger 2x für 10 min mit PBS gewaschen. Der Sekundärantikörper (Esel anti-Hühnchen-IgY-konjugiert mit Cy3 (#134843), Verdünnung 1:2000 [Dianova GmbH, Hamburg, D]) wurden nun auf die Schnitte pipettiert. Zum Nachweis von DNA des Zellkern wurde zusätzlich 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) (5%) ([Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, D]) hinzugegeben. Für 1 h wurden die Schnitte bei Raumtemperatur inkubiert, die Antikörperlösung abgenommen und danach erneut 2x mit PBS gewaschen. Nun folgte eine Fixierung für 10 min in 4%igem PFA und ein anschließendes zweimaliges Waschen in PBS für je 10 min. Zum Schluss wurden die Schnitte mit Mowiol und einem Deckglas eingedeckelt, bevor sie mittels Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet wurden.

2.10.6 Fluoreszenzmikroskopische Auswertung

Verwendete Materialien:

- Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2 Imaging mot [Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland]
- Axio Vision 4.8.2 [Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland]

Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop. Folgende Filter wurden verwendet:

Fluorochrom	Anregungsfilter (nm)	Dichroischer Spiegel (nm)	Sperrfilter (nm)
DAPI	360-370	400	420-460
Cy3	525-553	555	570-650

Tabelle 2: Filter und Farbstoffe der Fluoreszenzmikroskopie

Zu untersuchende Bildausschnitte wurden mit Axio Vision fotografiert und gespeichert. Die Bilder wurden mit einer Schwarzweiß-Kamera aufgezeichnet und Cy3 eine gelbliche Farbe und DAPI eine blaue Farbe zugewiesen. Die weitere Bearbeitung fand mit

Microsoft PowerPoint statt und beschränkte sich auf die Zellzählung und das Anpassen von Kontrast und Helligkeit.

2.11 ACh-Bestimmung durch HPLC

2.11.1 Probengewinnung

Verwendete Substanzen:

- phosphatgepufferte Kochsalzlösung
von Dulbecco (DPBS) [Life Technologies GmbH, Darmstadt, D]
- Calciumchlorid-Dihydrat [Merck KGaA, Darmstadt, D]
- Magnesiumsulfat [Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D]
- Glukose [Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, D]
- Cholinchlorid [Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, D]
- Glutamin [Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, D]
- Penicillin/Streptomycin (P/S) [Life Technologies GmbH, Darmstadt, D]
- Eserin [Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, D]
- Aceton [Merck KGaA, Darmstadt, D]
- Ameisensäure [Merck KGaA, Darmstadt, D]
- Stickstoff [Linde GmbH, Pullach, D]

Zur Kultivierung isolierter Zellen und Entnahme von Zellüberständen wurde folgendes Medium verwendet: DPBS mit 1,8 mM Calciumchlorid, 0,8 mM Magnesiumsulfat, 25 mM Dextrose, 10 µM Cholinchlorid, 1% P/S, 2 mM Glutamin (Wessler et al. 2013).

Entnommene Ganglien (vergleiche Kapitel 2.3.2f und Kapitel 2.5.2, ca. 16 Spinalganglien bzw. 2 JNC-Ganglien pro Reaktionsgefäß) wurden mit Kollagenase/Dispase dissoziiert. Anschließend wurden die isolierten Zellen mit DPBS gewaschen und in 500 µl DPBS-Medium mit 10 µM Eserin inkubiert. Nach 4 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden die Zellen abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und bei -20 °C eingefroren. Das Zellpellet wurde in 500 µl 85 % Aceton/ 15 % Ameisensäure gelöst, lysiert und gevortext. Anschließend wurde die Zellsuspension für 30 min auf Eis gestellt. Die Reaktionsgefäße wurden unter einen Stickstoffstrahl gestellt und nach vollständigem Abdampfen des Aceton/Ameisensäure-Gemischs bei -20 °C gelagert.

2.11.2 HPLC-Messung

Freundlicherweise wurden die Proben im Institut für Pathologie der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz durch Dr. Ignaz Wessler sowie durch Prof. Dr. Jochen Klein in Frankfurt am Main im Institut für Pharmakologie, Fachbereich 14, gemessen. Zur weiteren Methodenbeschreibung ist auf die gemeinsame Publikation verwiesen (Perniss et al. 2020).

2.12 Statistik

Die Auswertung der Experimente erfolgte mit Microsoft Excel (USA, Redmond, Washington). Die statistischen Datenanalysen und grafischen Darstellungen erfolgten mit Graph Pad Prism 7 (GraphPad Software, San Diego, CA 92108). Die Normalverteilung wurde mittels *D'Agostino-Pearson omnibus normality test* getestet. Bei gepaarten normalverteilten Proben wurde der t-Test verwendet, bei nicht normalverteilten Proben der Wilcoxon-Test. Bei unverbundenen und nicht normalverteilten Proben wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Wenn nicht anders angegeben, wurde der Standardfehler (SEM) angegeben. Bei $p < 0.05$ galt das Testergebnis als signifikant.

3. Ergebnisse

3.1 Quantale oder nqACh-Freisetzung

Um zu untersuchen, ob die bei *Nassenstein et al. (2015)* beobachtete tracheale Kontraktionszunahme nach Eseringabe im Organbad durch eine nqACh-Freisetzung zustande kam, oder Effekt einer quantalen (vesikulären) Freisetzung war, wurden Trachealabschnitte untersucht, die zuvor für 24 h bzw. 48 h in Botulinumtoxin (Botox) inkubiert wurden.

Bei den durchgeführten Versuchen wurden je 5 Trachealsegmente von verschiedenen Mäusen vor dem Einspannen ins Organbad mit Botulinumtoxin Typ A für je 24 h (n=3 Mäuse) und 48 h (n=4 Mäuse) inkubiert. Als Kontrolle wurden Tracheen für die gleiche Zeit in 0,9 % Natriumchlorid-Lösung (NaCl) inkubiert. Die Kontraktionen zu den Zeitpunkten 3 und 11 min nach Substanzgaben wurden statistisch verglichen. Die abgebildeten Boxplots (Abb. 3-1 B+D) zeigen die tracheale Kraft 3 und 11 min nach Eseringabe. Trotz 24-stündiger bzw. 48-stündiger Inkubation mit Botox konnten nach Eserin-Applikation dennoch Zunahmen der Kontraktion beobachtet werden. Die eserin-induzierte Kontraktionszunahme unterschied sich nicht signifikant zwischen Tracheen der Kontrollgruppe und mit Botox inkubierten Tracheen nach 11 min, sowohl nach 24-stündiger ($p=0,7$) als auch nach 48-stündiger ($p=0,83$) Inkubation. Bei den 24 h in Botox inkubierten Tracheen kam es nach Abschluss der ersten drei EFS-Stimulationen zu einer spontanen trachealen Kraftzunahme. Die dargestellten Ergebnissen lassen keinen Rückschluss auf den Vorgang der ACh-Freisetzung zu, da eine reduzierte Reaktion der EFS nach Botulinumtoxin Inkubation, als Kontrolle, zu erwarten gewesen wäre. Da die Trachealreaktionsfähigkeit mit der Zeit der Inkubation abnahm, wurde auf längere Inkubationszeiten verzichtet.

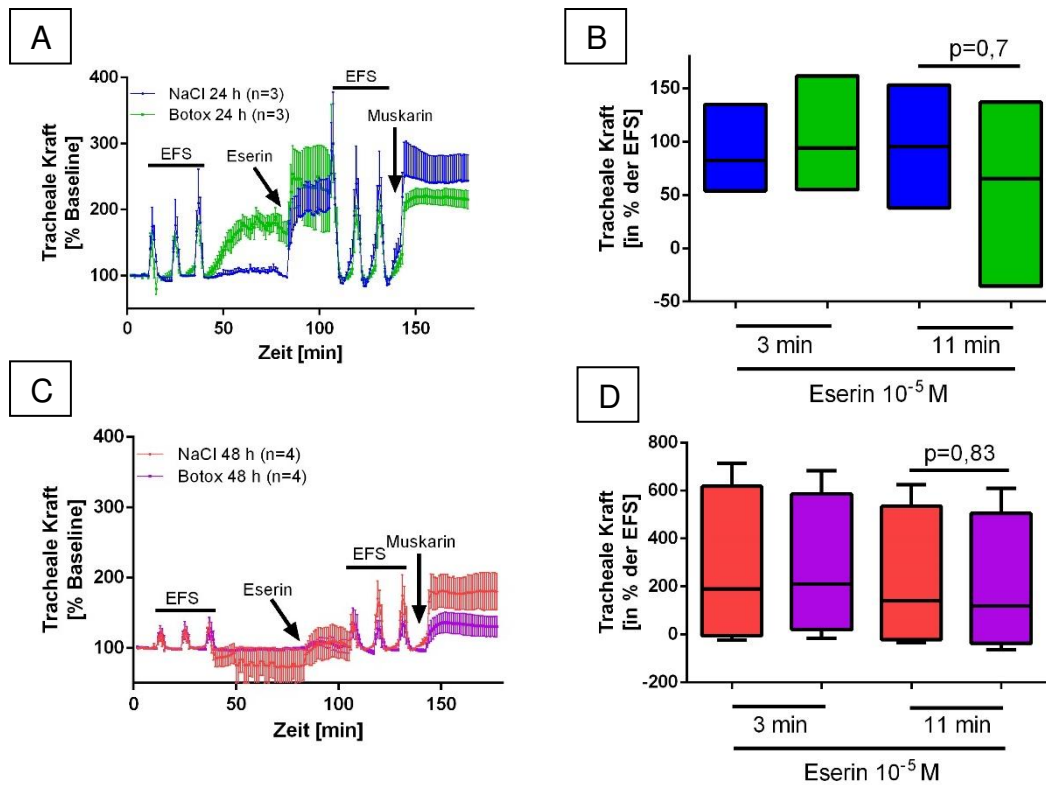


Abb. 3-1: **Tracheale Kraftzunahme in Organbadversuchen nach Inkubation mit Botulinumtoxin.** Gemessen wurde die tracheale Kraftzunahme, Vitalitätskontrolle vor und nach Eseringabe mittels EFS; Pfeile markieren die Applikation von Eserin und Muskarin (Positivkontrolle). **A:** Organbadversuche nach 24-stündiger Inkubation von Trachealringen in Botulinumtoxin Typ A (Botox, grün) und in NaCl (Kontrolle, blau). **B:** Die Boxplots der Messzeitpunkte 3 und 11 min nach Eseringabe zeigen keinen (Mann-Whitney-U-Test, $p=0,7$) Unterschied zwischen den mit Botox (grün) und ohne Botox (blau) inkubierten Trachealringen. **C:** Organbadversuche nach 48-stündiger Inkubation von Trachealringen in Botulinumtoxin Typ A (violett) und in NaCl (Kontrolle, rot). **D:** Die Boxplots zeigen den Anstieg zu den Messzeitpunkten 3 und 11 min nach Eseringabe; es besteht kein signifikanter Unterschied (Mann-Whitney-U-Test, $p=0,83$) Unterschied den mit Botox (violett) und ohne Botox (rot) inkubierten Trachealringen.

3.2 Bestimmung von ACh

Zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von freigesetztem ACh wurden Überstände aus Organbadversuchen und Zellkulturen gewonnen und mittels Ca^{2+} -Imaging-Experimenten an Reporterzellen und HPLC gemessen.

3.2.1 Ca^{2+} -Imaging: Einführende Experimente und Vorversuche

Sensitivität der Ca^{2+} -Imaging-Experimenten

Zur Bestimmung von ACh aus Überständen isolierter Zellen oder aus Organbadüberständen wurden M3WT4-Zellen verwendet. Diese Biosensorzellen (im Weiteren Reporterzellen) wurden zuvor auf beschichtete 12 mm runden Deckgläschen ausgesät und für 30-90 min mit Fura-2 AM beladen. In aufsteigender Reihenfolge wurden unterschiedliche ACh-Konzentrationen auf die Reporterzellen gegeben, beginnend mit einer Konzentration von 10^{-15} M. Ein signifikanter Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($p=0,0205$; gepaarter t-Test) war ab einer Konzentration von 10^{-12} M ACh zu beobachten (Abb.3-2). Der bei einer Konzentration von 10^{-13} M ACh gemessene Anstieg war bei der gewählten Versuchsanzahl nicht signifikant ($p=0,2225$; gepaarter t-Test). Insgesamt wurden 7 unabhängige Versuche durchgeführt.

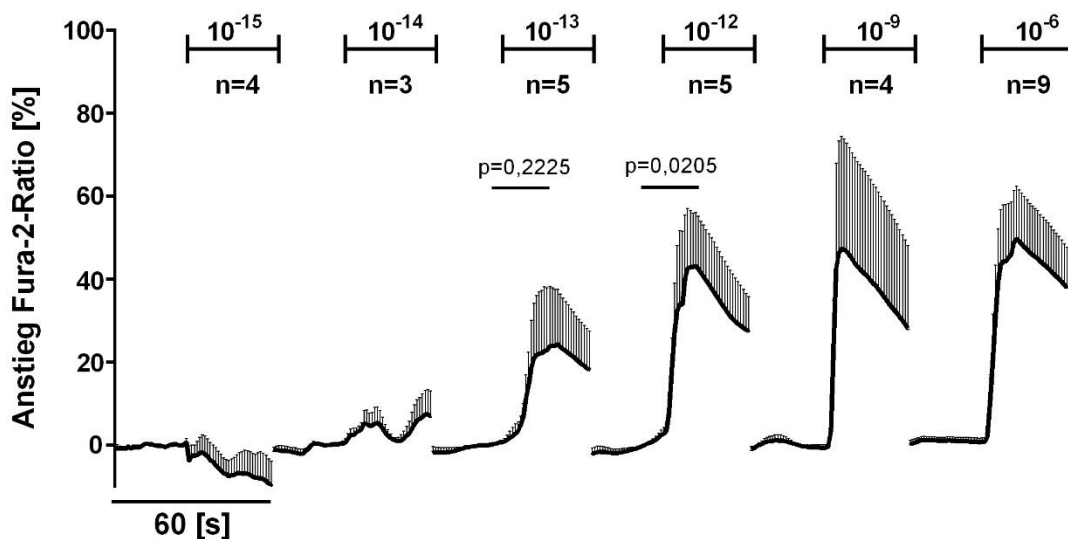


Abb. 3-2: Konzentrationsabhängige Reaktion von Reporterzellen auf ACh im Ca^{2+} -Imaging.

Die Grafik zeigt die gemittelten Mittelwerte der Reporterzellen auf den Deckgläschen (n). Dargestellt sind je 30 s vor bis 30 s nach Gabe von ACh + SEM; teilweise Applikation in aufsteigender Konzentration, oder Applikation einzelner Konzentrationen pro Deckgläschen. Mit Pfeilen markiert ist der Zeitpunkt der Stimulation mit ACh. Alle verwendeten Zellen haben mindestens auf einen Stimulus mit einem Anstieg $>10\%$ reagiert. Verglichen ist der Anstieg der Fura-2-Ratio [%] 55 s vor mit dem Maximum innerhalb der ersten 15 s nach Stimulation ACh (10^{-13} M) $p=0,2225$ (gepaarter t-Test). ACh (10^{-12} M) $p=0,0205$ (gepaarter t-Test).

Vorversuche zur Validierung der Calciumimaging-Versuche

Zur Vorbereitung weiterer Versuche wurde der Einfluss des Zellkulturmediums auf die Reaktionsfähigkeit von Reporterzellen untersucht. Verglichen wurden hierbei das empfohlene Medium für Reporterzellen, F-12-Medium, mit L15⁺-Medium, welches bei der Kultur von Neuronen verwendet wurde. In beiden Medien war eine deutliche Reaktion der Reporterzellen auf wiederholte Stimulation mit 10 μ M Muskarin nachweisbar. Die wiederholte Antwort auf den gleichen Stimulus war bei beiden Medien schwächer als die vorausgegangene. Zusammenfassend zeigte sich kein Unterschied in der Reaktionsfähigkeit der Reporterzellen ($p=0,79$; $n=2$ (F-12-Medium) und $n=3$ (L15⁺-Medium)). Im Durchschnitt betrug die Δ Fura-2-Ratio [%] für F-12-Medium 62,96 % und für L15⁺-Medium 60,47 % (Abb. 3-3). Für die Co-Kultivierung von Neuronen und Reporterzellen wurde sich für die Verwendung von L15⁺-Medium entschieden, um optimale Bedingungen für die Kultivierung von Neuronen zu bekommen. Weiteres zur Co-Kultivierung in Kapitel 3.5.

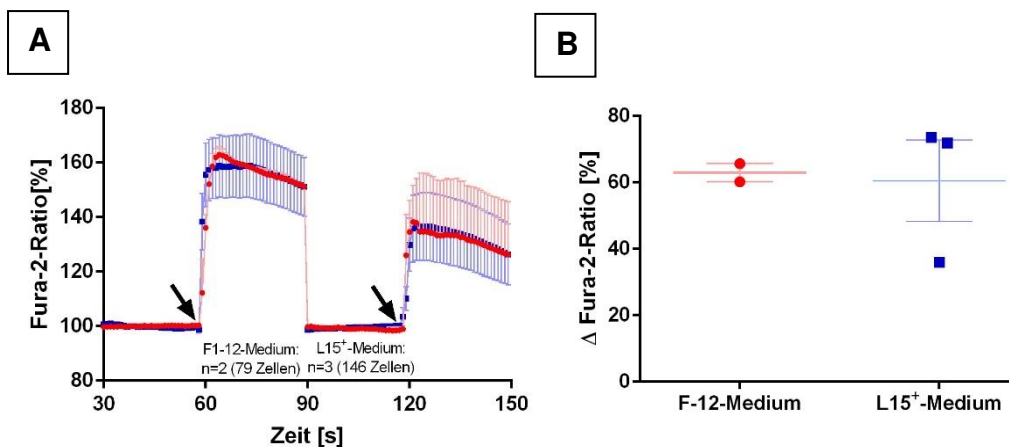


Abb. 3-3: Einfluss unterschiedlicher Kulturmedien (F-12-Medium und L15⁺-Medium) auf Ca²⁺-Imaging-Experimente mit Reporterzellen.

A: Dargestellt sind die gemittelten Ergebnisse der Reporterzellen \pm SEM auf n Deckgläschen, 30 s vor Applikation von 10 μ M Muskarin (59-61 s) bis 30 s danach, anschließend wiederholte Gabe von 10 μ M Muskarin, alle verwendeten Zellen haben mindestens auf einen Muskarin-Stimulus mit einem Anstieg um mind. 10% reagiert. **B:** Vergleich der Anstiege in % Baseline. Dargestellt sind der Mittelwert und die SEM.

Morphologische Unterscheidung von Neuronen und Reporterzellen anhand der Zellgrößen

Durch die TRPV1-Cre/tomato-flox-Mäuse war es möglich, mit dem Fluoreszenzmikroskop rot leuchtende TRPV1⁺-Neurone von anderen Zellen zu unterscheiden (Abb. 3-4 A). Zusätzlich ließ die Zellgröße eine Vermutung über die Zellpopulation zu. Diesbezüglich wurden Zellen ausgezählt und verglichen. 271 ausgezählte Reporterzellen hatten im Durchschnitt einen Zelldurchmesser von 16,3 µm. 771 ausgemessene TRPV1⁺-Neurone aus DRG hatten im Mittel einen Durchmesser von 22,0 µm. Die Reporterzellen waren im Vergleich zu den TRPV1⁺-Neuronen aus DRG signifikant kleiner ($p < 0,0001$; Mann-Whitney-U-Test). Von 180 ausgezählten TRPV1⁻-Neuronen aus DRG betrug der Zelldurchmesser im Durchschnitt 30,4 µm. Die Reporterzellen waren im Vergleich zu den TRPV1⁻-Neuronen aus DRG signifikant kleiner ($p < 0,0001$; Mann-Whitney-U-Test) (Abb. 3-5).

163 gemessene TRPV1⁺-Neurone aus JNC hatten im Mittel einen Durchmesser von 23,3 µm. Im Mittel kamen 73 ausgezählte TRPV1⁻-Neurone aus JNC auf einen Durchmesser von 25,7 µm. Die Reporterzellen waren im Vergleich zu den TRPV1^{-/+}-Neuronen aus JNC signifikant kleiner ($p < 0,0001$; Mann-Whitney-U-Test) (Abb. 3-4).

Die TRPV1⁺-Neurone aus JNC ($p = 0,0139$; Mann-Whitney-U-Test) und aus DRG ($p < 0,0001$; Mann-Whitney-U-Test) waren signifikant kleiner als die TRPV1⁻-Neurone aus JNC bzw. DRG (Abb. 3-4).

Die gemessenen Zelldurchmesser der Reporterzellen waren somit signifikant kleiner als die zuvor gemessenen und beschriebenen Neurone. Die TRPV1⁺-Neurone waren signifikant kleiner als die TRPV1⁻-Neurone aus dem jeweiligen Ganglion. Der Durchmesser gab so bereits einen Eindruck, um welche Zellpopulation es sich handelt, unabhängig von der Reaktion auf spezifische Stimuli.

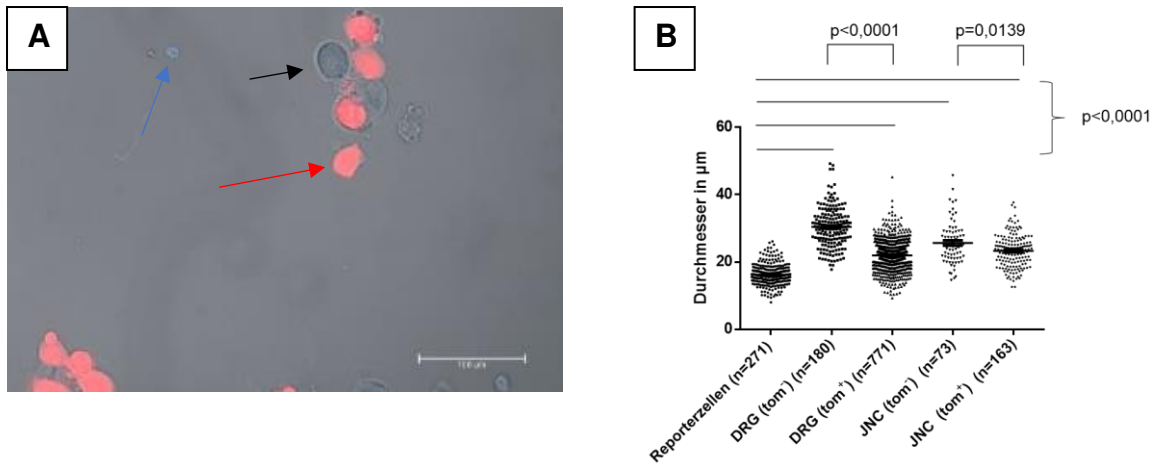


Abb. 3-4: **Reporterzellen sind signifikant kleiner als Neurone aus DRG und JNC**

A: Gezeigt sind rot leuchtende TRPV1⁺-Neurone (tomato⁺(tom⁺)) (roter Pfeil), nicht leuchtende TRPV1⁻-Neurone (tomato⁻(tom⁻)) (schwarzer Pfeil) und Reporterzellen (blauer Pfeil). **B:** Gezählt und ausgemessen wurden Neurone und Reporterzellen, ausgesät auf Deckgläschen. Verglichen wurden die Reporterzellen mit der jeweiligen Neuronenpopulation. Zusätzlich wurden die TRPV1⁺-Neurone mit den jeweiligen TRPV1⁻-Neuronen verglichen. Die Reporterzellen waren im Vergleich zu den Neuronen aus DRG oder JNC signifikant kleiner ($p < 0,0001$, Mann-Whitney-U-Test). Die TRPV1⁺-Neurone aus JNC ($p = 0,0139$; Mann-Whitney-U-Test) und aus DRG ($p < 0,0001$; Mann-Whitney-U-Test) waren signifikant kleiner als die TRPV1⁻-Neurone aus JNC bzw. DRG.

Unterschiedliche Beladezeiten von Reporterzellen mit Fura-2 AM

Nicht nur das Medium kann Einfluss auf die Reaktionsfähigkeit der Zellen nehmen, sondern auch die Beladezeit der Zellen mit Fura-2 kann einen Einfluss auf die Detektierbarkeit der Reaktionsfähigkeit haben. Um zu untersuchen, wie die Beladezeit Einfluss auf die Detektierbarkeit nimmt, wurde ein orientierender Versuch durchgeführt, bei dem die Zellantwort nach unterschiedlichen Beladezeiten ermittelt wurde (Abb. 3-5). Die orientierende Untersuchung der Beladezeit der Reporterzellen mit Fura-2 von 30 bis 120 min zeigte jeweils eine signifikante Reaktion auf die messbare Antwort der Reporterzellen nach Stimulation. Für die weiteren Versuche wurde eine Beladezeit von mind. 30 min bis max. 90 min gewählt.

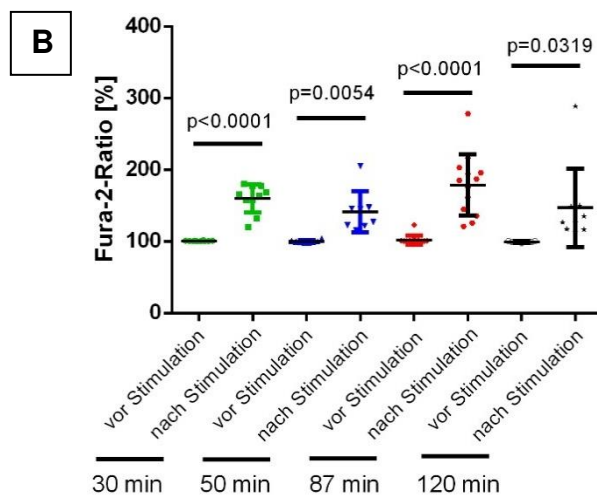
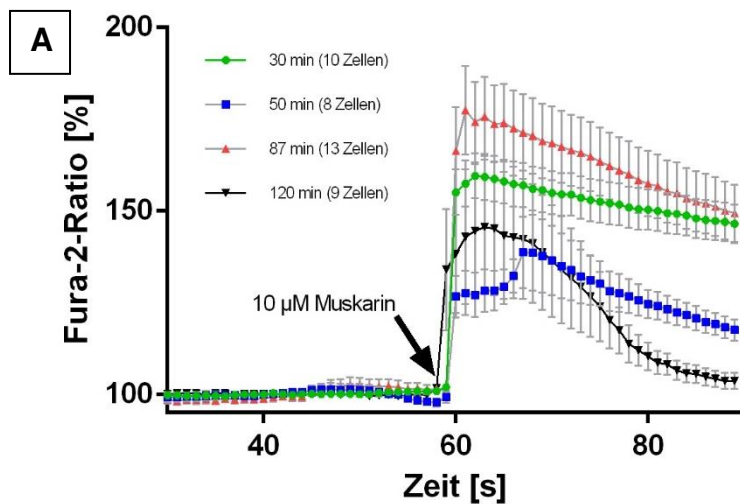


Abb. 3-5: Reaktionsfähigkeit von mAChR3-Reporterzellen in Abhängigkeit von der Beladezeit mit Fura-2 AM.

A: Angegeben sind die Mittelwerte aus 8-13 Zellen \pm SEM auf (je $n=1$) Deckgläschen. Dargestellt sind 30 s vor bis 30 s nach Stimulation mit 10 μ M Muskarin. Angegeben ist die jeweilige Beladezeit mit Fura-2 AM von 30, 50, 87 und 120 min. Pfeil: Gabe von 10 μ M Muskarin. Alle verwendeten Zellen haben auf den Muskarin-Stimulus mit mindestens einem Anstieg $>10\%$ reagiert.

B: Gezeigt ist die Auswertung bei Sekunde 55 vor Stimulation mit 10 μ M Muskarin verglichen mit dem Maximum 15 s nach Stimulation. Der jeweilige Anstieg ist signifikant ($p < 0,0001$ - $p = 0,0319$; gepaarter t-Test).

Repetitive Stimulation von Reporterzellen mit ACh

Um zu untersuchen, ob eine wiederholte Stimulation zu vergleichbaren maximalen $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegen führt, wurden Reporterzellen wiederholt mit ACh stimuliert (Abb. 3-6). Die wiederholte Stimulation von Reporterzellen zeigte eine Abnahme der Antwort auf folgende Stimulationen mit gleicher ACh-Konzentration (10^{-6} M oder 10^{-9} M). Dabei scheint es, dass höhere Konzentrationen (10^{-6} M) früher bzw. stärker zu einer Desensibilisierung führen als niedrigere Konzentrationen (10^{-9} M) des Agonisten.

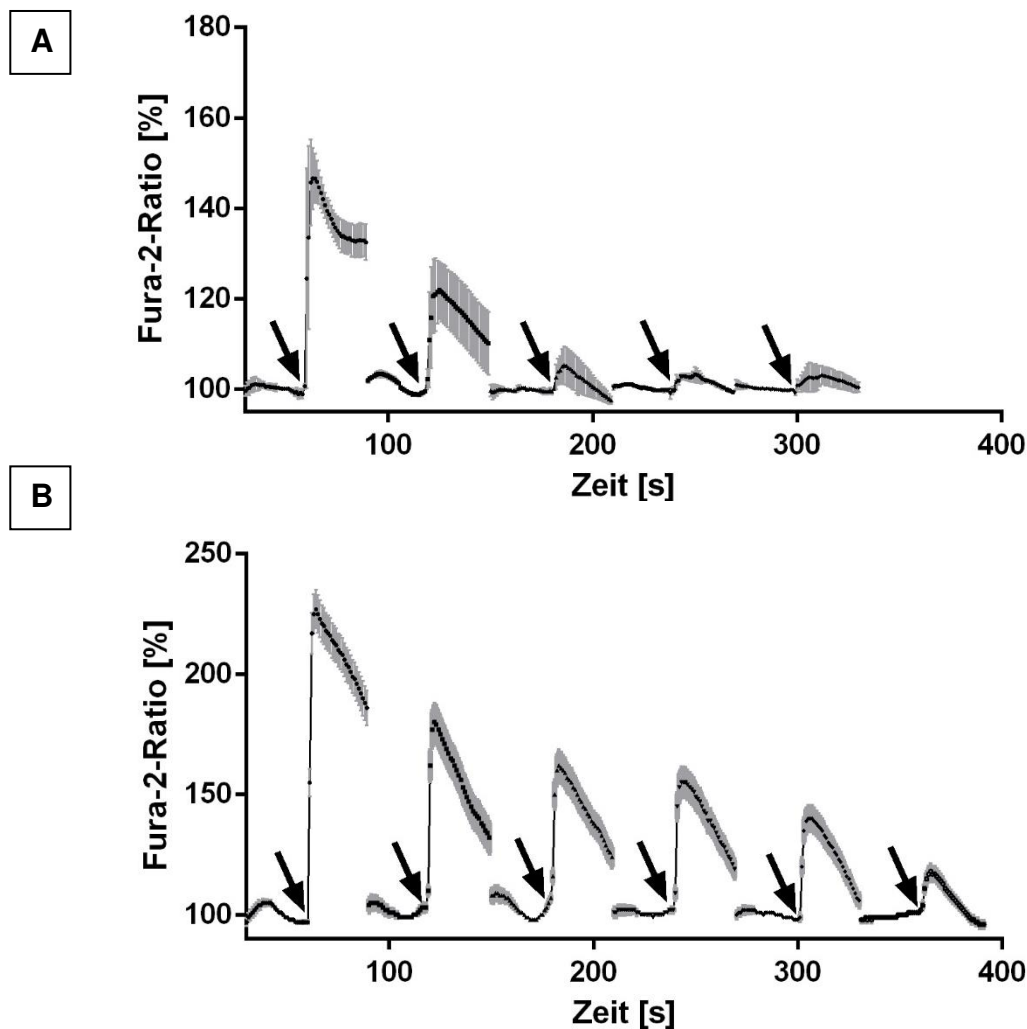


Abb. 3-6: **Repetitive Stimulation von mAChR3-Reporterzellen mit ACh (10^{-6} M bzw. 10^{-9} M).**
A: ACh (10^{-6} M) Dargestellt sind die gemittelten Ergebnisse der Mittelwerte der Zellen auf n Deckgläschen ($n=2$; 59 Zellen) \pm SEM, 30 s vor Gabe von ACh (60 s) bis 30 s nach Gabe. Zwischen den einzelnen Applikationen wurde für 2 min gewaschen. Die Pfeile markieren den Zeitpunkt der Applikation mit 10^{-6} M ACh. Ausgewertet wurden nur Zellen, die mindestens auf einen ACh-Stimulus reagiert hatten (Anstieg $> 10\%$). **B:** ACh (10^{-9} M) Dargestellt sind Mittelwerte der Zellen \pm SEM auf einem Deckgläschen (61 Zellen), 30 s vor Gabe von ACh (60 s) bis 30 s nach Gabe. Zwischen den einzelnen Applikationen wurde für 2 min gewaschen. Die Pfeile markieren den Zeitpunkt der Applikation von 10^{-9} M ACh. Ausgewertet wurden nur Zellen, die mindestens auf eine ACh-Stimulation reagierten (Anstieg $> 10\%$).

3.2.2 Organbad: Vorversuch - Kumulierte Dosis-Wirkungskurve

Um die Kontraktionskraft von Trachealabschnitten auf unterschiedliche ACh-Konzentrationen zu untersuchen, wurde eine Messreihe erstellt, bei der Trachealabschnitte (n=5) mit ACh in aufsteigender Konzentration (10^{-12} M bis 10^{-4} M), stimuliert wurden. Angegeben sind die gemessenen Maxima nach Stimulation mit der jeweiligen ACh-Konzentration. Die mittlere effektive Konzentration (EC₅₀) betrug $1,025^{-7}$ M ($5,859^{-8}$ – $1,792^{-7}$ (95%-Konfidenzintervall)) (Abb. 3-7).

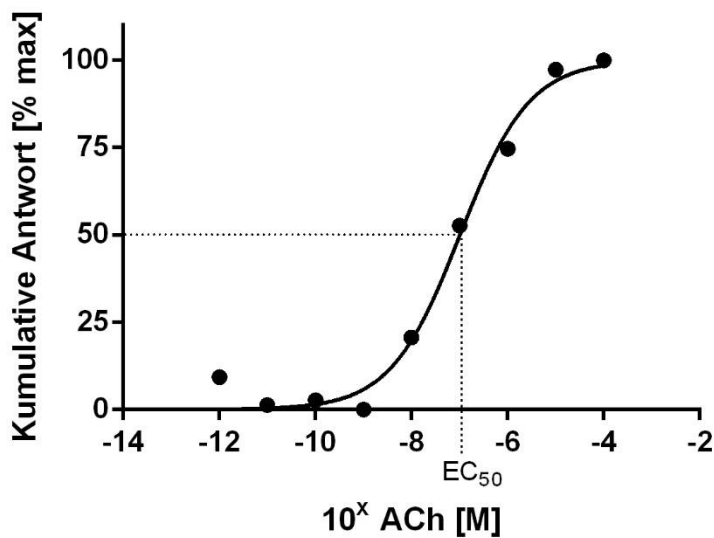


Abb. 3-7: Kumulative Dosis-Wirkungskurve der trachealen Kontraktionskraft nach Stimulation mit aufsteigenden ACh-Konzentrationen.

Dargestellt ist eine kumulative Dosis-Wirkungskurve von n=5 Trachealabschnitten. Die mittlere effektive Konzentration (EC₅₀) betrug $1,025^{-7}$ M ACh.

3.3 Tracheale ACh-Freisetzung

Stimulation von mAChR3-Zellen mit Überständen aus Organbadversuchen

Die 5 kaudalen Trachealringe von 5 Tracheen wurden in das Organbad eingespannt. Nach Kalibrierung und EFS zur Vitalitätskontrolle wurde dem Medium 10 μM Eserin beigefügt und eine Kontraktionszunahme war feststellbar. Nach 10 min wurde das Medium entnommen. 500 μl dieses Mediums wurden im Ca^{2+} -Imaging auf Reporterzellen gegeben. Nach Stimulation mit Überstand kam es zu einem signifikanten Anstieg ($p < 0,01$; gepaarter t-Test) der $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Die Reaktion war durch 10 μM Atropin inhibierbar. Hierfür wurde kurz vor Hinzugabe des Überstandes Atropin dem die Zellen umspülendem Puffer hinzugegeben. Der Unterschied der Stimulation mit und ohne Atropin war signifikant ($p < 0,01$; gepaarter t-Test) (Abb. 3-8). Die beobachtete Reaktion auf den Überstand und die Inhibierbarkeit durch Atropin weisen auf eine mögliche tracheale ACh-Freisetzung hin.

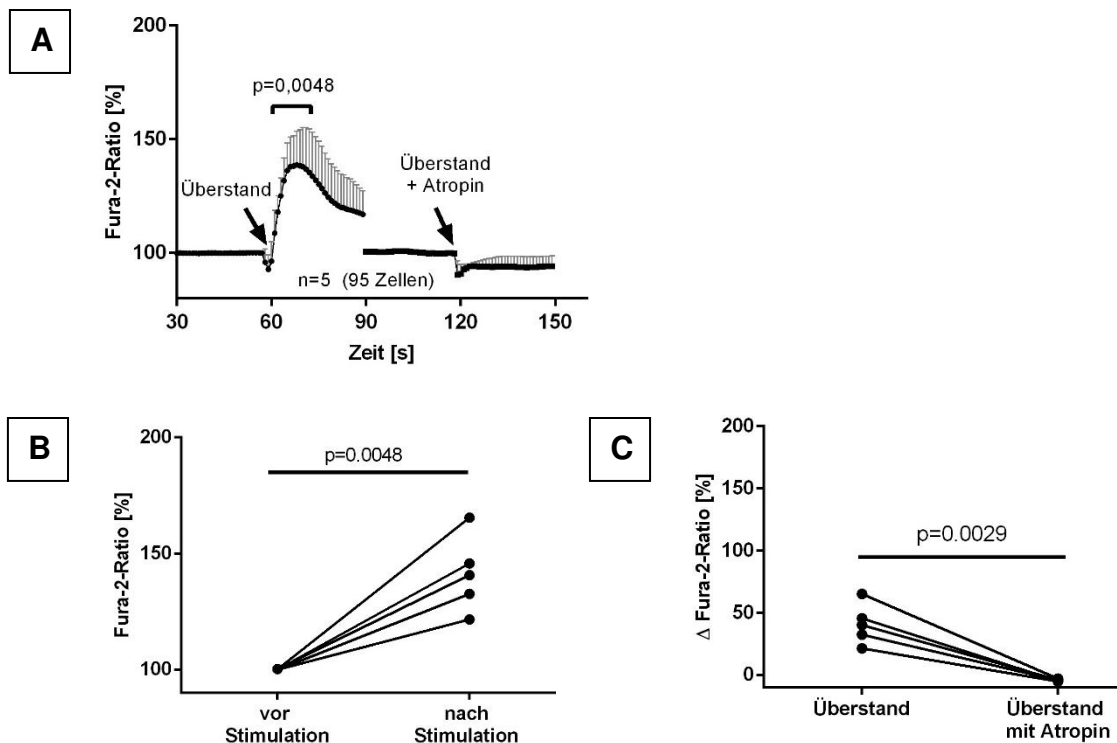


Abb. 3-8: Reaktion von mAChR3-Reporterzellen im Ca^{2+} -Imaging auf Organbadüberstände.

A: Die Grafik zeigt den Mittelwert aus den Mittelwerten der Zellen auf den Deckgläschen ($n=5$) \pm SEM, dargestellt sind 30 s vor bis 30 s nach Stimulation mit Überstand \pm Atropin. Die verwendeten Zellen hatten mindestens mit einem Anstieg $> 10\%$ reagiert. Die Pfeile markieren die Stimulation. 1. Pfeil: Stimulation mit 500 μl Überstand von Tracheen aus dem Organbad 2. Pfeil: Stimulation mit 500 μl Überstand + 10 μM Atropin.

B: Verglichen ist der Anstieg % Baseline Fura-2 55 s vor und dem Maximum innerhalb der ersten 15 s nach Stimulation mit dem Überstand ($p=0,0048$; gepaarter t-Test).

C: Verglichen sind jeweils die maximale Δ Fura-2-Ratio [%] innerhalb von 15 Sekunden nach Stimulation mit Überstand und Überstand + Atropin ($p=0,0029$; gepaarter t-Test).

Immunhistochemische Färbung der Trachea

Immunhistochemischen Färbungen von B6.Cg-Tg(RP23-268L19-EGFP)2Mik/J (ChAT^{BAC}-eGFP)-Mäusen (n=3) (Abb. 3-9), angefärbt mit Antikörper gegen GFP, zeigten ChAT-GFP⁺-Strukturen in der Trachea und Lunge. Markiert sind einzelne positiv leuchtende Zellen (mit Pfeil markiert) im Flimmerepithel sowie Teile der glatten Muskulatur (Dreiecke).

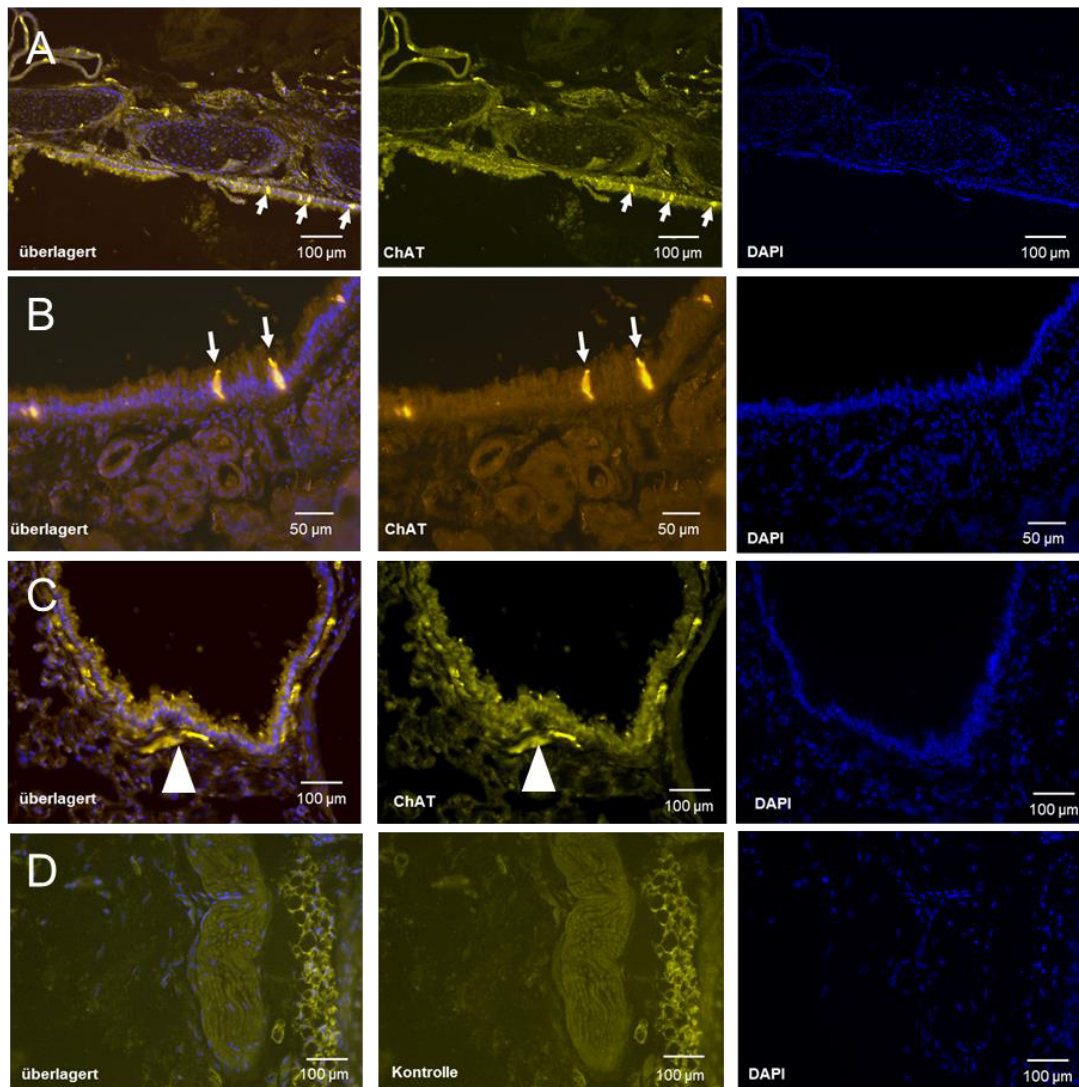


Abb. 3-9: Immunhistochemische Lokalisation GFP-positiver Strukturen in Trachea und Lungenabschnitten von ChAT-eGFP-Mäusen.

A-C (je überlagert/Cy3/DAPI), D: Negativkontrolle (ohne Primärantikörper). Pfeile: ChAT-eGFP⁺-Zellen im Flimmerepithel. Pfeilspitzen: ChAT-eGFP⁺ glatte Muskelzellen. n=3 Mäuse.

3.4 Epithelfreie Trachealabschnitte als Quelle einer ACh-Freisetzung

RT-PCR

Mittels RT-PCR wurde untersucht, ob in epithelfreien Trachealabschnitten mRNA-Expression von Proteinen, die in Neuronen für ACh-Synthese nötig sind, exprimiert werden. Von 6 Mäusen wurden die Tracheen entnommen. Das Epithel wurde mechanisch mittels Zellschratcher entfernt. Jede tracheale Probe, in der das Epithel entfernt wurde, wurde auf die mRNA-Expression von ChT1 und ChAT sowie β -Aktin untersucht. ChAT-mRNA war bei 5 von 6 Proben nachweisbar und ChT1-mRNA zeigte sich bei 4 von 6 Proben (Abb. 3-10).

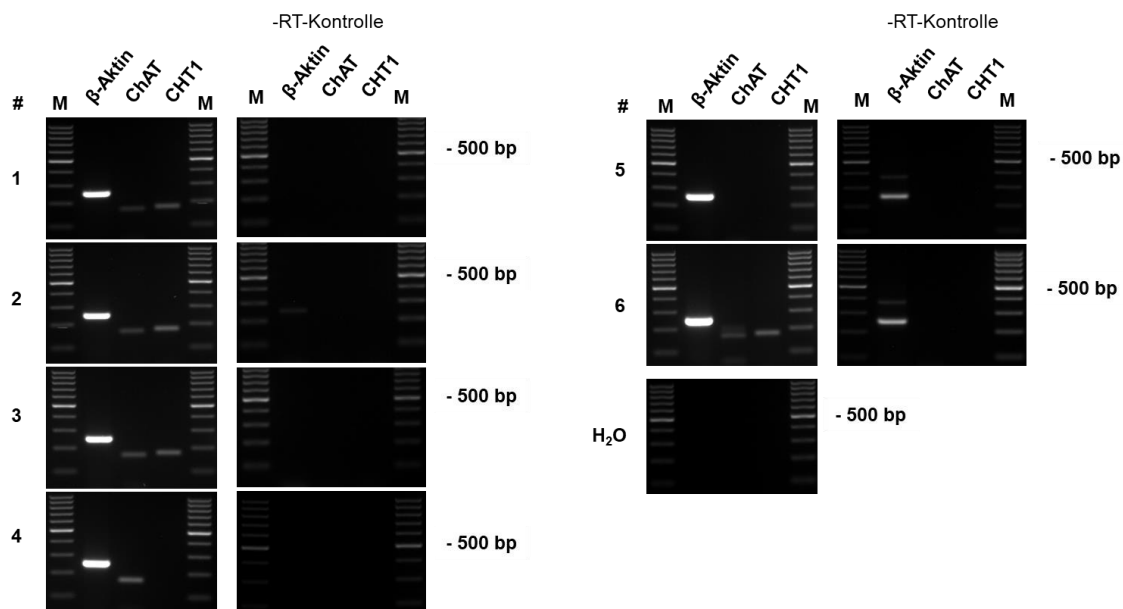


Abb. 3-10: Nachweis einer mRNA-Expression von ChAT und ChT1 in epithelfreien Trachealabschnitten.

RT-PCR, Gelelektrophorese in einem 2%igem Agarose-Gel von n=6 murinen Tracheen (# 1-6). Verwendet wurden intron-spannende Primer. Die Abbildung zeigt die mRNA-Expression von ChT1 in 4 von 6 Trachealabschnitten und ChAT in 5 von 6 Proben. Auf der jeweils rechten Seite ist die -RT der jeweiligen PCR dargestellt. H₂O = Wasserkontrolle. M = 100 bp-Marker; die kräftigere Markerbande markiert 500 bp. Erwartete Amplikongröße: β -Aktin (249 bp); ChAT (163 bp); ChT1 (174 bp).

3.5 Sensorische Neurone als Quelle einer ACh-Freisetzung

3.5.1 Co-Kultivierung von sensorischen Neuronen mit mAChR3-Reporterzellen

Um eine direkte ACh-Freisetzung aus sensorischen Neuronen zu untersuchen, wurden Co-Kultivierungen von mAChR3-Reporterzellen und dissoziierten Neuronen aus TRPV1-Cre/tomato-flox Mäusen (rot leuchtende C-Faser-Neurone) durchgeführt. Zuerst wurden die Neurone auf Deckgläschen ausgesät und über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Reporterzellen zu den Neuronen hinzugegeben und kurz inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Fura-2 beladen (Abb. 3-11).

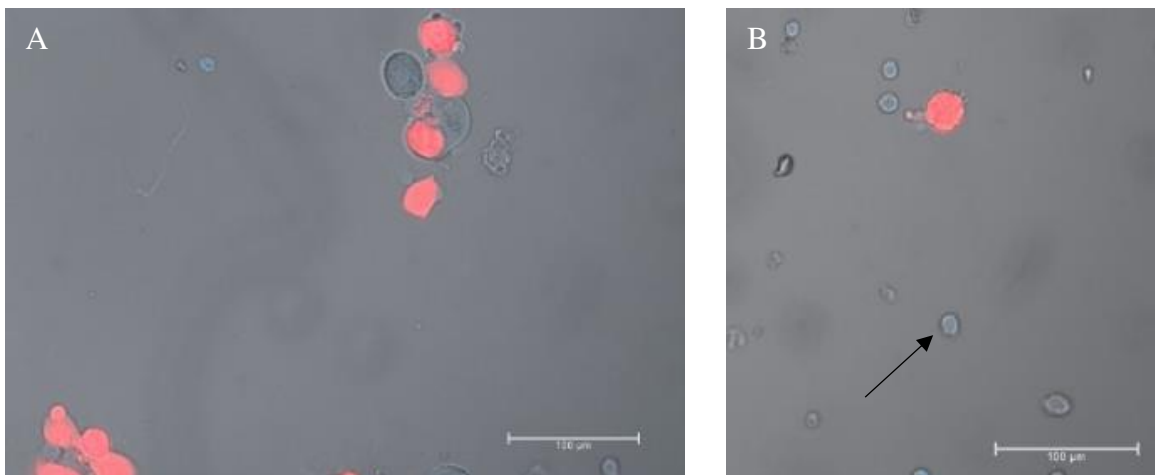


Abb. 3-11: **Aufnahmen von kultivierten Reporterzellen und Neuronen mit dem Leica Dm5000B-Mikroskop (20fache Objektivvergrößerung).**

Co-Kultivierung von isolierten Neuronen aus TRPV1-Cre/tomato-flox-Mäusen mit mAChR3-Reporterzellen. Die Abbildung zeigt repräsentativ Ausschnitte der inkubierten und zellbeladenen Deckgläschen. **A:** DRG und **B:** JNC mit mAChR3-Reporterzellen. Rot leuchtend sind TRPV1⁺-Neurone. Die Reporterzellen sind die deutlich kleineren Zellen (Pfeil). Die nicht leuchtenden größeren Zellen sind TRPV1⁻-Neurone. Maßstab: 100 µm.

Auf den Deckgläschen der Co-Kultivierung waren ausgesäte Neurone mit vereinzelt Reporterzellen zu sehen (Abb. 3-11). Die Unterscheidung der Neurone von den Reporterzellen erfolgte anhand der Reaktivität nach Stimulation mit Capsaicin (CPS) (vgl. Abb. 2.5), einem TRPV1-Agonist, und anhand der rotleuchtenden Fluoreszenz der TRPV1⁺-Neurone. Zu Beginn der Messung wurde 10 µM Eserin auf das Deckgläschen gegeben und die Umwälzpumpe ausgestellt. Für die nächsten 4 min wurden sensorischen Neurone und Reporterzellen beobachtet. Anschließend erfolgten Kontrollstimuli mit 10 µM Muskarin, 300 nM CPS und 400 mM KCl, um die Vitalität zu untersuchen sowie den neuronalen Subtyp der Neurone zu bestimmen.

Bei der Co-Kultivierung von DRG-Neuronen mit Reporterzellen (Abb. 3-12 A) zeigte sich kein Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ während des 4 min Zeitintervalls. Die Vitalitätskontrollen auf Muskarin, CPS und KCl waren bei der Co-Kultivierung mit DRG-Neuronen ebenfalls negativ (Abb. 3-12 A). Es ist davon auszugehen, dass die Vitalität der Zellen stark herabgesetzt war oder dass Fehler beim Versuchsablauf zu diesem Ergebnis führten. Bei Co-Kultivierung von Reporterzellen mit JNC-Neuronen (Abb. 3-12) zeigte sich innerhalb des 4 min Zeitintervalls nach Eseringabe kein Anstieg in % Baseline in den Reporterzellen oder den Neuronen. Die Kontrollen auf Muskarin und CPS wurden zur Überprüfung der Vitalität der Zellpopulationen durchgeführt. Eine Reaktion auf Muskarin war bei den Reporterzellen der Co-Kultivierung mit JNC-Neuronen nachweisbar (Abb. 3-12 B). Eine geringe Reaktion zeigten die TRPV1⁺-Neurone auf CPS. Auf KCl war keine Reaktion nachweisbar.

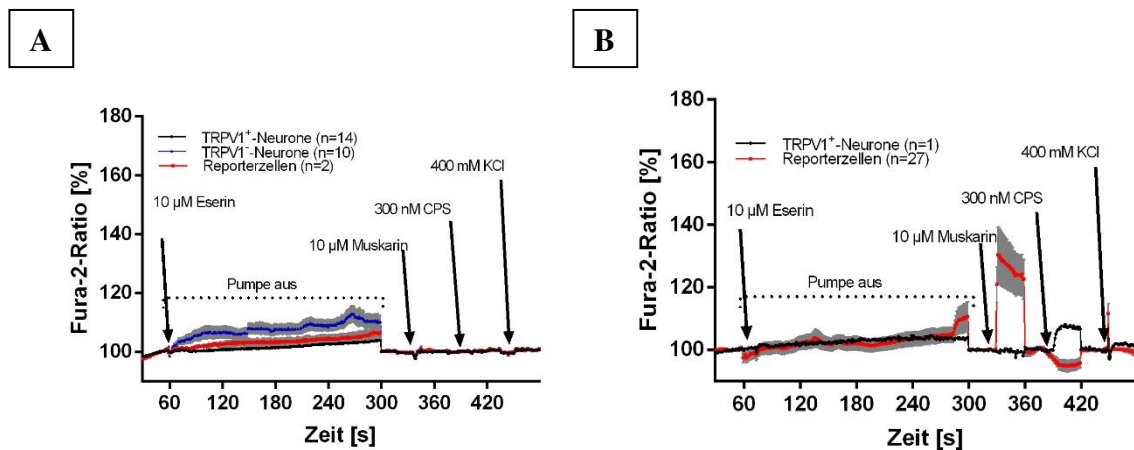


Abb. 3-12: **Co-Kultivierung von isolierten Neuronen und Reporterzellen.**

Die Neurone wurden über Nacht inkubiert und die Reporterzellen am nächsten Tag hinzugegeben. Die Abbildungen zeigen die Ergebnisse eines Versuchs. **A:** Co-Kultivierung von DRG (n=14 TRPV1⁺-Neurone und n=10 TRPV1⁻-Neurone) und Reporterzellen (n=2) **B:** Co-Kultivierung von JNC (n=1 TRPV1⁺-Neurone) und Reporterzellen (n=27).

Bei der oben beschriebenen Methodik zur Erstellung der Co-Kultivierung zeigte sich das Problem der Adhärenz der Reporterzellen. Die Reporterzellen setzten sich nur wenig auf dem Deckgläschen ab und waren folglich nur begrenzt messbar. Die Methodik wurde daraufhin nicht weiterverfolgt. Aus diesem Grund wurden Neurone und Reporterzellen gemeinsam auf dem Deckgläschen ausgesät und im folgenden Experiment über Nacht inkubiert.

Im Vergleich zu den zuvor gezeigten Bildern wurden die Zellen gemeinsam über Nacht inkubiert. Es war zu beobachten, dass sich die Morphologie der Reporterzellen in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer veränderte. Je länger inkubiert wurde, desto eher nahmen sie Spindelform an (Abb. 3-13 A).

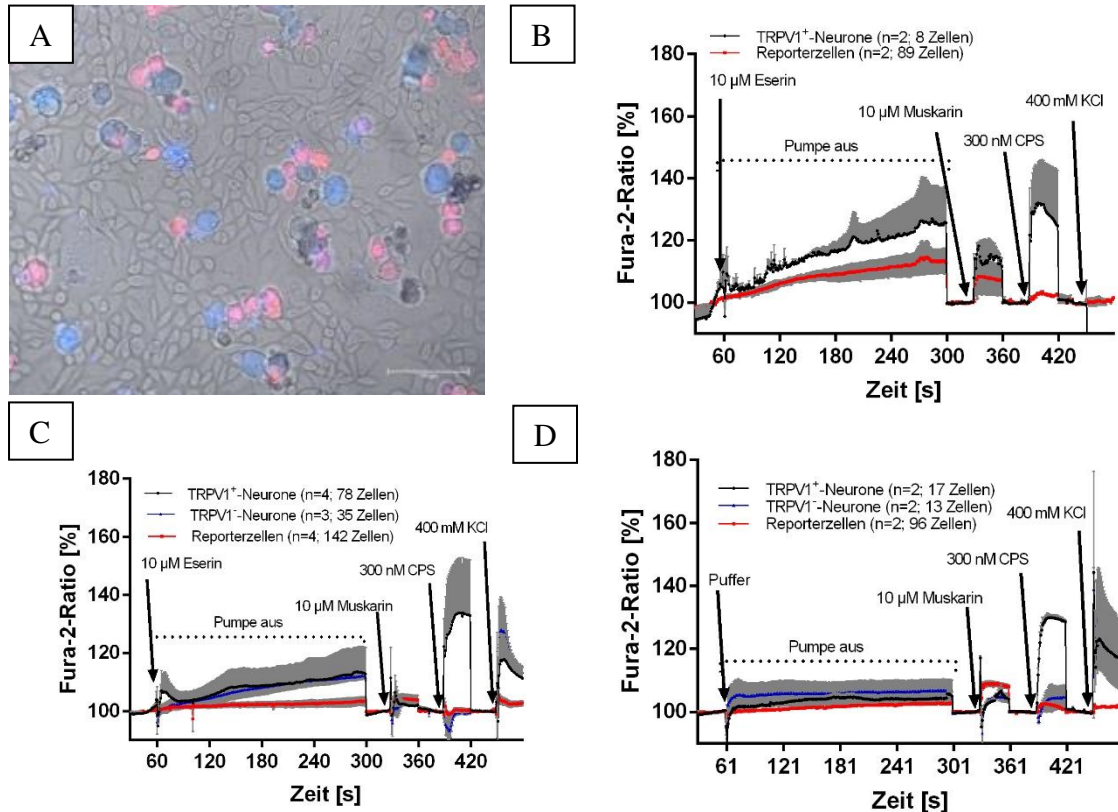


Abb. 3-13: Ca²⁺-Imaging von Reporterzellen und Neuronen in Co-Kultur zur Messung einer ACh-Freisetzung.

A: Leica Dm5000B (20fache Objektivvergrößerung). Co-Kultivierung von DRG-Neuronen mit Reporterzellen. Rot leuchtend sind TRPV1⁺-Neurone. Die Reporterzellen sind die deutlich kleineren und teils spindelförmigen Zellen. Die nicht leuchtenden größeren Zellen sind u.a. TRPV1⁻-Neurone. Maßstab 100 μm. **B-D:** Die Neurone und die Reporterzellen wurden zeitgleich auf das Deckgläschen ausgesät und inkubiert. Die Grafik zeigt jeweils die Mittelwerte aus den Mittelwerten (±SEM) der Reporterzellen und Neuronen auf den Deckgläschen (n); Pfeilspitze: 10 μM Muskarin; Pfeil (durchgezogen): 300 nM CPS; Pfeil (gestrichelt): 400 mM KCl. **B:** Co-Kultivierung von JNC-Neuronen und Reporterzellen, Applikation von Eserin bei Sekunde 60. Bei den TRPV1⁺-Neuronen (p=0,0156; Wilcoxon-Test) und den Reporterzellen (p<0,0001; Wilcoxon-Test) kam es zu einem signifikanten Anstieg der Fura-2-Ratio [%]. **C:** Co-Kultivierung von DRG-Neuronen und Reporterzellen, Gabe von Eserin bei Sekunde 60 **D:** Co-Kultivierung von DRG-Neuronen und Reporterzellen, Applikation von Puffer (Kontrolle) bei Sekunde 60.

Im Ca²⁺-Imaging wurde die Fura-2-Ratio [%] der TRPV1⁺-Neurone (n=8 Zellen) einer Co-Kultivierung von JNC-Neuronen mit Reporterzellen bei Sekunde 55 (vor Eserinapplikation) und bei Sekunde 298 (nach Applikation) innerhalb des vierminütigen Messintervalls verglichen (Abb. 3-13 B). Bei den TRPV1⁺-Neuronen kam es zu einem signifikanten Anstieg der Fura-2-Ratio [%] (p=0,0156; Wilcoxon-Test). Bei den Reporterzellen kam ebenfalls es zu einem signifikanten Anstieg der Fura-2-Ratio [%] (p<0,0001; Wilcoxon-Test) (Abb. 3-13 B und 3-14 A).

Verglichen wurde die Änderung der Fura-2-Ratio [%] der TRPV1⁺-Neurone nach Eserin- bzw. Pufferapplikation. Hierbei zeigte sich bei den TRPV1⁺-Neuronen (n=17-78 Zellen; 2-4 Deckgläschen) kein signifikanter Unterschied (p=0,6081 Mann-Whitney-Test), eine bei den Reporterzellen (n=96-142 Zellen; 2-4 Deckgläschen) nahezu signifikante (p=0,0523; Mann-Whitney-Test) und bei den TRPV1⁻-Neuronen (n=13-35 Zellen; 2-3 Deckgläschen) eine signifikante (p=0,0026; Mann-Whitney-Test) (Abb. 3-13 C+D und Abb. 3-14 B) größere Änderung nach Eseringabe.

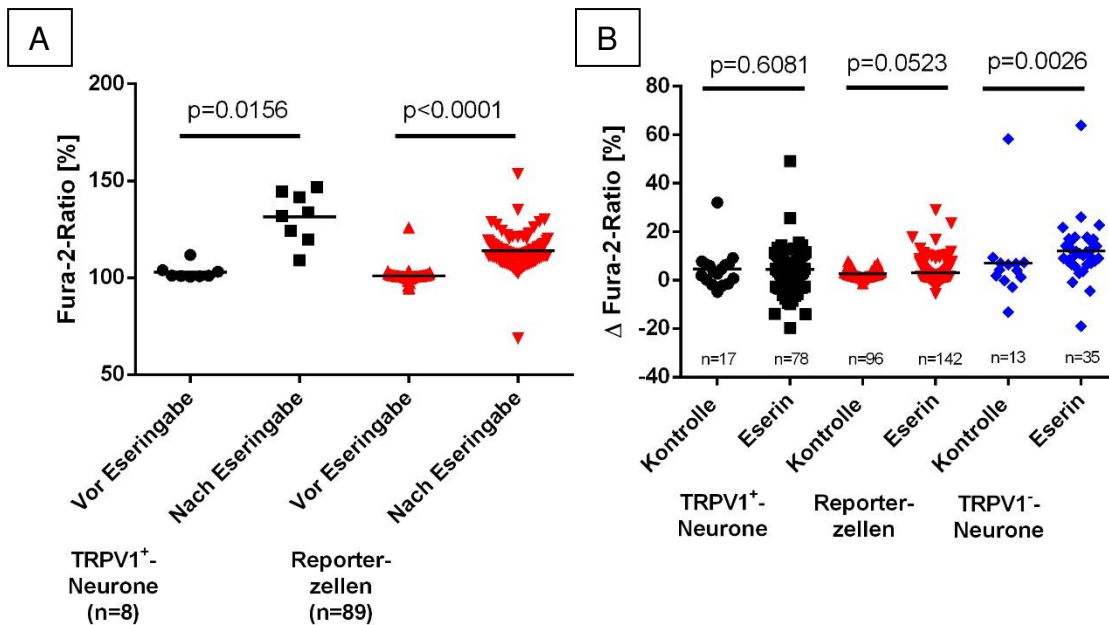


Abb. 3-14: Statistische Auswertung der Ca²⁺-Imaging-Messungen von Co-Kultivierung isolierter Neurone aus JNC und DRG mit Reporterzellen.

Die Grafik zeigt **A** die Fura-2-Ratio [%] bzw. **B** die Änderung der Fura-2-Ratio [%] der Zellpopulationen (TRPV1⁺/TRPV1⁻-Neurone/Reporterzellen) auf den Deckgläschen. **A**: Dargestellt ist die Fura-2-Ratio [%] der TRPV1⁺-Neurone (n=8 Zellen; 1 Deckgläschen) einer Co-Kultivierung von JNC mit Reporterzellen bei Sekunde 55 (vor Eseringabe) und bei Sekunde 298 (nach Eseringabe). Bei den TRPV1⁺-Neuronen kam es zu einem signifikanten Anstieg der Fura-2-Ratio [%] (p=0,0156; Wilcoxon-Test). Bei den Reporterzellen kam es zu einem signifikanten Anstieg der Fura-2-Ratio [%] (p<0,0001; Wilcoxon-Test). **B**: Dargestellt ist die Änderung der Fura-2-Ratio [%] (Differenz aus (Vor Stimulation) Sekunde 55 und (nach Stimulation) Sekunde 298) bei TRPV1⁺/TRPV1⁻-Neurone/Reporterzellen einer Co-Kultivierung von DRG mit Reporterzellen. Verglichen ist die Änderung nach Applikation von Eserin mit der nach Applikation von Puffer.

Analysiert wurden ausschließlich Neurone, die mindestens auf einen Stimulus reagierten. Die Zellantwort der Reporterzellen auf die Positivkontrolle war teils reduziert, was an den Kulturbedingungen der Reporterzellen im Medium der Neurone liegen könnte. Zur weiteren und gezielteren Untersuchung wurde sich vermehrt auf die Messung von Überständen aus isolierten und dissoziierten Neuronen, der Durchführung von RT-PCR-Versuchen zum mRNA-Nachweis und die Messungen mittels HPLC konzentriert, um zu

prüfen, ob sensorische Neurone in der Lage sind, ACh zu synthetisieren und ins Medium abzugeben.

Expression muskarinischer Rezeptoren in isolierten TRPV1⁺-Neuronen

Um zu untersuchen, ob es sich bei der im Ca²⁺-Imaging beobachteten Zellreaktion um eine über muskarinische Rezeptoren vermittelte Reaktion handeln könnte, wurde die mRNA-Expression von mACh-Rezeptoren in einzeln gepickten sensorischen Neuronen mittels RT-PCR untersucht. Von insgesamt 20 untersuchten TRPV1⁺-Neuronen konnte bei einem Neuron mRNA für mAChR1, bei einem Neuron mRNA für mAChR3 und bei einem Neuron mRNA für mAChR5 nachgewiesen werden (Abb. 3-15). Bei insgesamt 40% der Neuronen wurde mRNA für mAChR4 nachgewiesen.

Bei 40 % der untersuchten Neurone waren mAChR nachweisbar. Die Minderheit dieser wies mAChR1, 3 oder 5 auf, die Ca²⁺-abhängige Signalwege über den Phospholipase C-Signalweg aufweisen und entsprechend im Ca²⁺-Imaging zu einem Anstieg führen können.

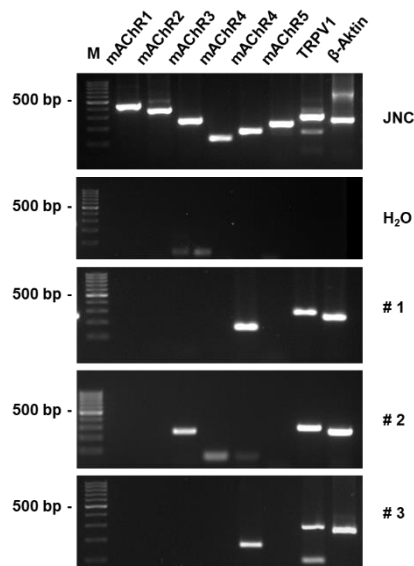


Abb. 3-15: Nachweis von mAChR-mRNA in isolierten JNC-Neuronen.

Gelelektrophorese in einem 2%igem Agarose-Gel. Dargestellt sind drei der 20 isolierten TRPV1⁺-Neurone (Neuron #1-3) als Beispiele gepickter Neurone mit nachweisbarer mRNA-Expression für mAChR, TRPV1 und β -Aktin. Positivkontrolle: cDNA von murinem JNC; #1 bis #3: Beispiele gepickter Neurone mit positiver Bande für mAChR3, mAChR4, TRPV1 und/oder β -Aktin. M = 100 bp Marker, „dickere“ Bande entspricht 500 bp. H₂O = Wasserkontrolle. Erwartete Amplikongröße: mAChR1 (441 bp); mAChR2 (369 bp); mAChR3 (245 bp); mAChR4 (245 bp); mAChR5 (216 bp); TRPV1 (285 bp); β -Aktin (249 bp).

3.5.2 Sensorische Neurone als Quelle einer ACh-Freisetzung

Immunhistochemische Färbung von DRG

Um zu untersuchen, ob Neurone aus DRG in der Lage sind ACh zu synthetisieren, wurden immunhistochemische Färbungen von DRG angefertigt. Verwendet wurden B6.Cg-Tg(RP23-268L19-EGFP)2Mik/J (ChATBAC-eGFP)-Mäuse. Durch Anfärbung mit einem Antikörper gegen GFP konnten ChAT-GFP⁺-Neurone gezeigt werden (Abb. 3-16).

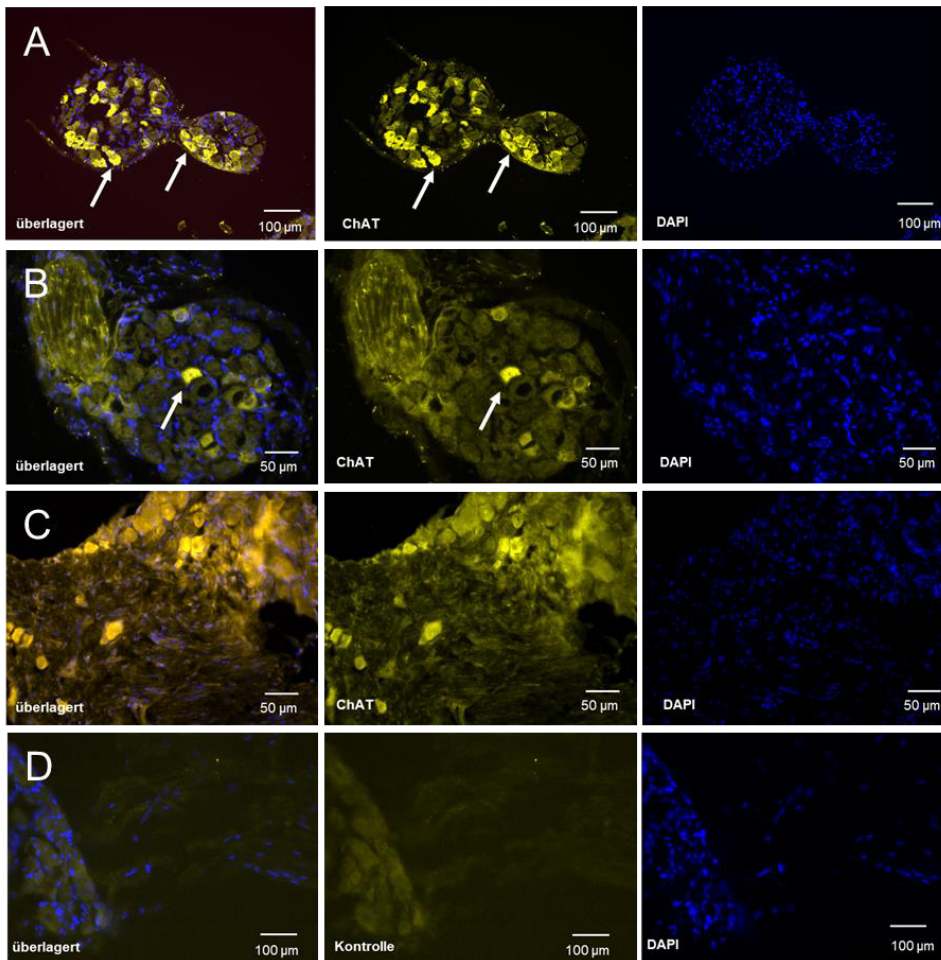


Abb. 3-16: **Immunhistochemische Lokalisation ChAT-GFP⁺-Strukturen in DRG.**

Repräsentative Aufnahmen von immunhistochemischen Färbungen aus DRG von B6.Cg-Tg(RP23-268L19-EGFP)2Mik/J (ChATBAC-eGFP)-Mäusen (n=3) zeigen vereinzelt ChAT⁺-GFP⁺-Neurone (pfeilmarkiert). Die Abbildungen (A-C) zeigen einzelne Ausschnitte aus DRG mit ChAT⁺-GFP⁺-Neuronen. Aufnahme in 10x und 20x Objektivvergrößerung, D: Negativkontrolle (ohne Primärantikörper).

RT-PCR-Ergebnisse

Um zu untersuchen, ob Spinalganglien-Neurone mRNA für Proteine der ACh-Synthese und -Freisetzung exprimieren, wurden DRG aus thorakalen Abschnitten präpariert und mittels RT-PCR auf mRNA von CTLs, CHT1 und ChAT untersucht. Mittels Zellpicken und *single-cell*-RT-PCR wurden 9 TRPV1⁺-Neurone untersucht (Abb. 3-17). Fünf davon wiesen CTL1-mRNA auf. Bei 4 von 9 Neuronen war CTL2-mRNA nachweisbar. Bei einem Neuron (#7) war CTL4-mRNA schwach nachweisbar. CTL3- und 5-, CHT1- und ChAT-mRNA wurden nicht nachgewiesen. Die Gelelektrophorese der RT-PCR zeigt bei CHT1 und ChAT, aber auch bei CTL1 deutliche Primerdimere mit Banden <100 bp. Die zu erwartenden Banden wären bei 163 bp (ChAT) und 174 bp (CHT1) gewesen. Die in #8 zu sehenden Schlieren sind artifiziell durch eine mögliche Kontamination der Probe entstanden. Die sichtbaren Banden (ca. 600 bp bei #6 und #8) in dem Agarose-Gel für CTL3 entsprechen nicht der zu erwartenden PCR-Produktgröße von 122 bp. Ursächlich könnte das Vorliegen von genomischer DNA sein.

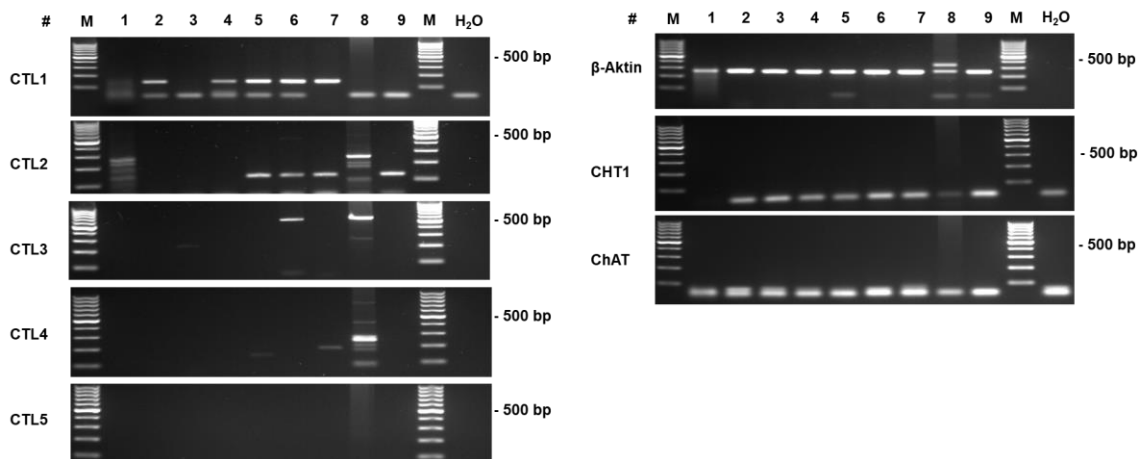


Abb. 3-17: **mRNA-Nachweis cholinergischer Komponenten in isolierten Spinalganglienneuronen.** Gelelektrophorese einer RT-PCR in einem 2%igem Agarose-Gel. n=9 Neurone (#1-9); Untersucht wurden 9 isolierte TRPV1⁺-Neurone aus DRG auf mRNA-Expression für CTL1-5, CHT1 und ChAT. CTL1-mRNA war bei 44%; CTL2-mRNA bei 33% nachweisbar. mRNA für CTL4 in 11% und CTL3 und 5, ChAT und CHT1 war nicht nachweisbar. M = 100 bp Marker, „dickere“ Bande entspricht 500 bp. H₂O = Wasserkontrolle. Erwartete Amplikongröße: CTL1 (140 bp); CTL2 (126 bp); CTL3 (122 bp); CTL4 (155 bp); CTL5 (180 bp); CHT1 (174 bp); β -Aktin (249 bp), ChAT (163 bp).

Wirkung von Überständen von kultivierten DRG-Neuronen auf mAChR3-Reporterzellen im Ca²⁺-Imaging

Da DRG potenziell in der Lage sind, ACh zu synthetisieren, wurden Überstände isolierter DRGs nach Applikation von Eserin gewonnen und mit Hilfe von mAChR3-Reporterzellen im Ca²⁺-Imaging gemessen.

Auf unterschiedliche Art und Weise wurde versucht, mAChR3-Reporterzellen mit Überständen (mit Eserin) von DRGs zu stimulieren. Sowohl die Injektion von 500 µl Überstand in das Medium als auch die Applikation von 300 µl Überstand mit Hilfe einer langen Spritze in die Nähe der Zellen, sowie eine Kammer, bei der mittels kleinster Injektionsnadeln Volumina von 150-300 µl Überstand auf die Reporterzellen gegeben wurden, lieferten keinen signifikanten Nachweis eines [Ca²⁺]_i-Anstiegs in den Reporterzellen (Abb. 3-18). Nach Applikation des Überstandes kam es hingegen zu einem signifikanten Abfall der Fura-2-Ratio % (Abb. 3-18 B).

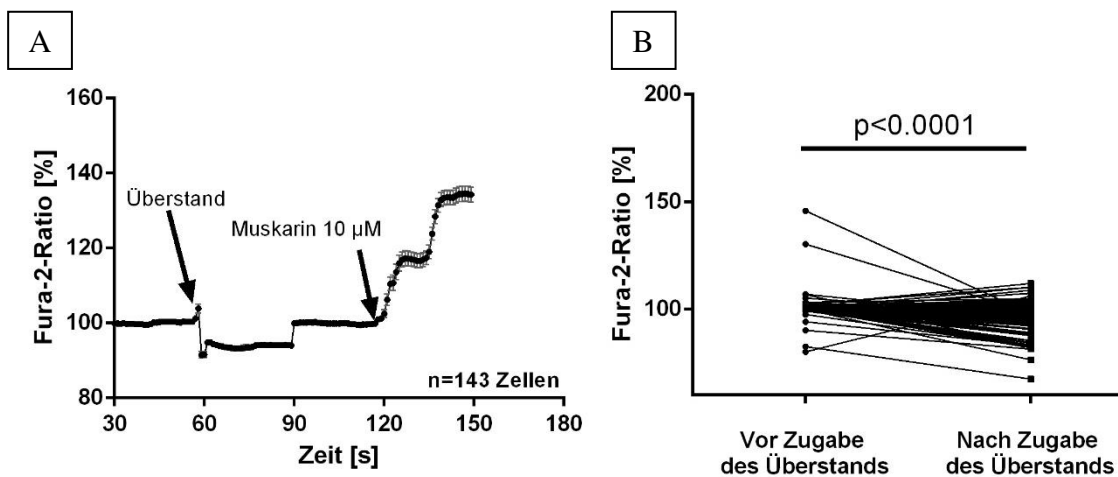


Abb. 3-18: **Reaktion von mAChR3-Reporterzellen im Ca²⁺-Imaging auf Überstände von Spinalganglien.**

A: Dargestellt ist das gemittelte Ergebnis aus den Mittelwerten der Reporterzellen der Deckgläschen (n=3). In die Auswertung eingegangen sind 143 Reporterzellen, die auf 10 µM Muskarin, den Kontrollstimulus, mit einem Anstieg der Baseline um mindestens 10 % reagierten.

B: Die Grafik zeigt die Veränderung der Fura-2-Ratio [%] nach Zugabe des Zellüberstands. Verglichen ist der prozentuale Anstieg 5 Sekunden vor Stimulation mit dem maximalen Anstieg innerhalb der ersten 15 Sekunden nach Stimulation (p < 0,0001; gepaarter t-Test).

3.5.3 Neurone des JNC als Quelle einer ACh-Freisetzung, immunhistochemische Färbung von JNC

Um zu untersuchen, ob Neurone aus JNC in der Lage sind ACh zu synthetisieren, wurden immunhistochemische Färbungen von JNC angefertigt. Verwendet wurden B6.Cg-Tg(RP23-268L19-EGFP)2Mik/J (ChATBAC-eGFP)-Mäuse. Durch Anfärbung mit einem Antikörper gegen GFP konnten ChAT-GFP⁺-Strukturen, -Zellen und -Nervenfasern gezeigt werden (Abb. 3-19).

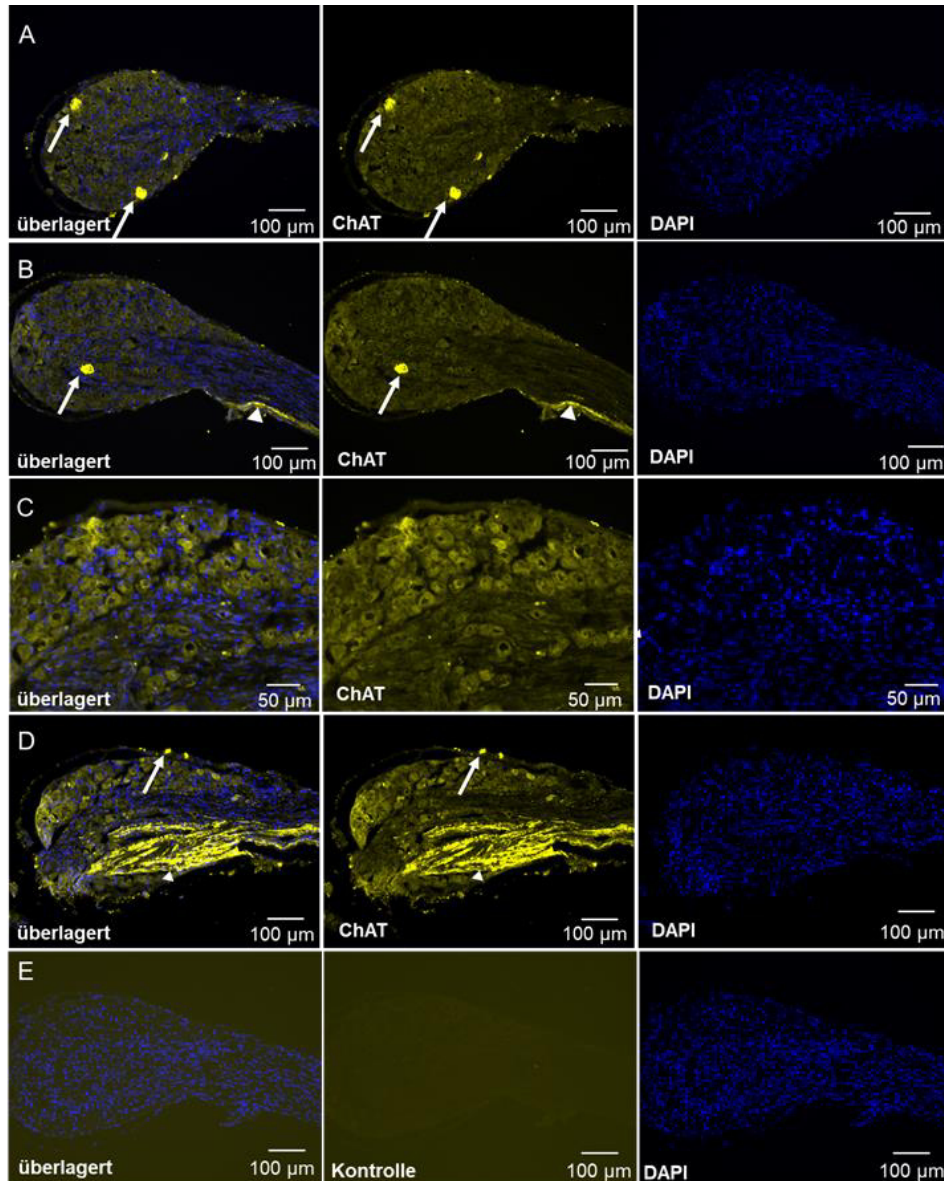


Abb. 3-19: **Immunhistochemische Lokalisation ChAT-GFP⁺-Strukturen in JNC.**

Immunhistochemische Färbungen von JNC aus Mäusen (n=3) zeigen vereinzelt ChAT⁺-GFP⁺-Zellen (Pfeilmarkiert). Die Abbildung (A-E) zeigt einzelne Ausschnitte aus JNC mit teils positiven Strukturen, Neuronen und Nervenfasern.

A-D (je überlagert/CY3/DAPI) Aufnahme in 10x und 20x Objektivvergrößerung, **E** Negativkontrolle (ohne Primärantikörper). Pfeile: ChAT⁺-GFP⁺-Neurone. Dreiecke: Nervenfasern.

RT-PCR-Ergebnisse

Um zu untersuchen, ob JNC-Neurone mRNA für Proteine der ACh-Synthese und -Freisetzung exprimieren, wurden die JNC präpariert und die mRNA Expression von CTLs, CHT1 und ChAT untersucht. Durch single-cell-RT-PCR wurden einzeln gepickte Neurone auf mRNA-Expression von CTL1-5, CHT1 und ChAT untersucht (Abb. 3-20). Bei 8 der 8 untersuchten Zellen wurde CTL1-mRNA bzw. und/oder eine Variante (CTL1.1) und bei 6 von 8 Neuronen CTL2-mRNA nachgewiesen. Vereinzelt, mit 2 von 8 Neuronen, wurde CTL5-mRNA nachgewiesen. CTL3-4-, CHT1- und ChAT-mRNA waren nicht nachweisbar. Die Gelelektrophorese der RT-PCR zeigte bei CHT1 und ChAT deutliche Primerdimere mit Banden <100 bp. Bei CTL3 und CTL4 waren diese schwach zu erkennen. Die zu erwartenden Banden wären bei 163 bp (ChAT) und 174 bp (CHT1) sowie bei 122 bp (CTL3) und 155 bp (CTL4) gewesen.

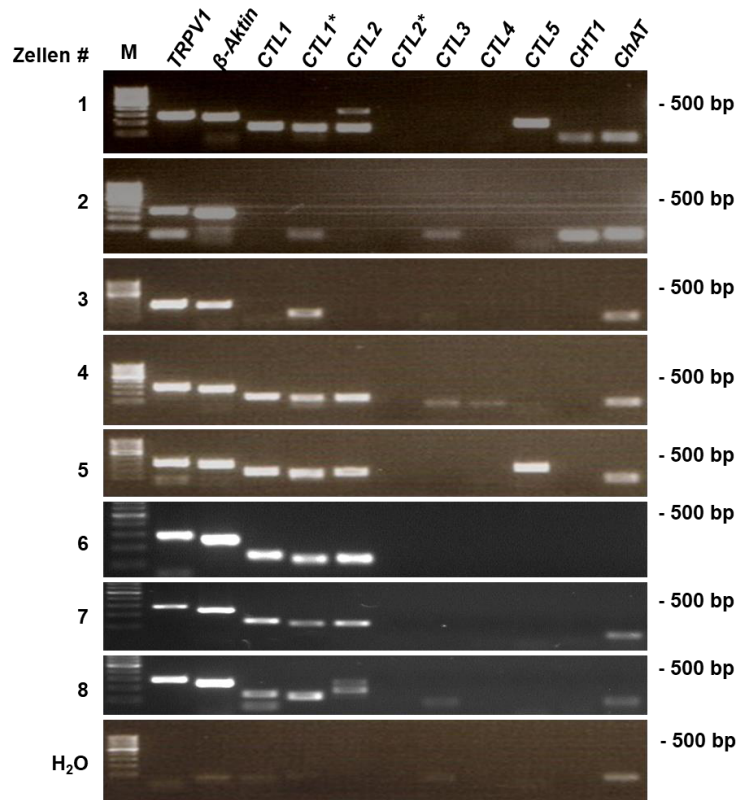


Abb. 3-20: **mRNA-Expression von CTL1-5, CHT1 und ChAT sowie β -Aktin in isolierten JNC-Neuronen.** Gelelektrophorese in einem 2%igem Agarose-Gel. RT-PCR-Ergebnisse von gepickten JNC-Neuronen. Untersucht wurden 8 isolierte TRPV1⁺-Neurone aus JNC auf mRNA-Expression für CTL1-5, CHT1 und ChAT. CTL1-mRNA war bei 89%; CTL2-mRNA bei 78% und CTL5-mRNA war bei 22% nachweisbar. mRNA für CTL3-4, ChAT und CHT1 war nicht nachweisbar. M = 100 bp Marker, „dickere“ Bande entspricht 500 bp. H₂O = Wasserkontrolle. * 2. Primerpaar. Erwartete Amplikongröße: CTL1 (140 bp); CTL1* (121 bp); CTL2 (126 bp); CTL2* (178 bp); CTL3 (122 bp); CTL4 (155 bp); CTL5 (180 bp); CHT1 (174 bp); β -Aktin (249 bp); ChAT (163 bp).

Wirkung von Überständen von JNC auf mAChR3-Reporterzellen im Ca²⁺-Imaging

Die mögliche Freisetzung von ACh aus JNC-Neuronen wurde mittels einer Kammer, bei der mittels kleinster Injektionsnadeln Volumina von 150-300 µl Überstand auf die Reporterzellen gegeben wurden, untersucht. Reporterzellen wurden mit Überständen von dissoziierten JNC-Neuronen, die mit Eserin behandelt wurden, in der beschriebenen Kammer durch direkte Injektion stimuliert (Abb. 3-21).

Nachdem die Ergebnisse der Calciumimaging-Experimente einen signifikanten Anstieg ($p < 0,0001$; Wilcoxon-Test) auf den Überstand der JNC-Neurone zeigten, wurden Überstände von JNC und DRG mittels HPLC auf ACh untersucht.

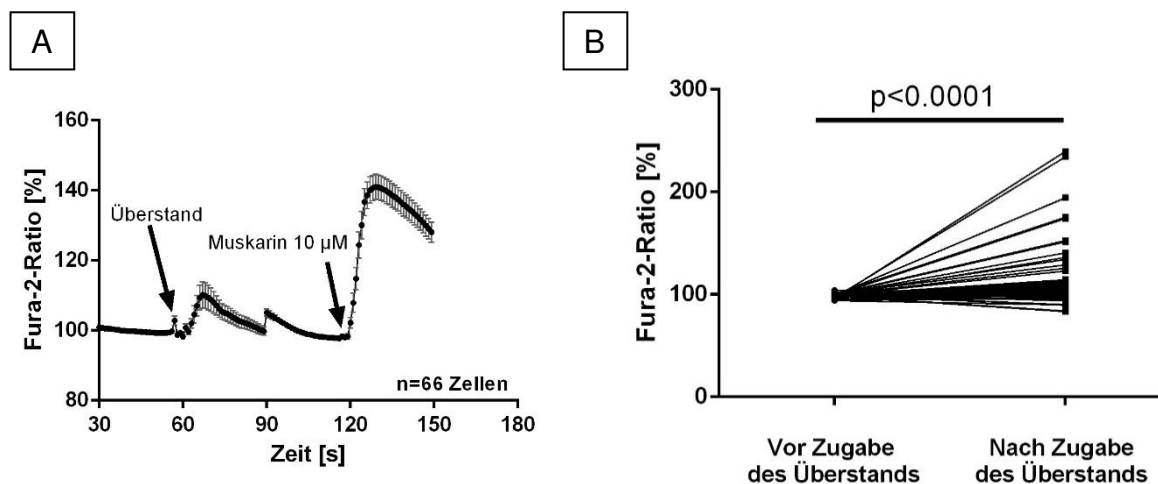


Abb. 3-21: Signifikante Reaktion im Ca²⁺-Imaging von mAChR3-Reporterzellen auf Überstände von Neuronen aus JNC.

A: Dargestellt ist der Mittelwert aus den Mittelwerten der Reporterzellen auf den Deckgläschen (n=4). In die Auswertung eingegangen sind 66 Reporterzellen, die auf 10 µM Muskarin, den Kontrollstimulus, mit einem Anstieg >10 % der Baseline reagierten.

B: Die Grafik zeigt den Fura-2-Ratio in % nach Stimulation mit dem Zellüberstand. Verglichen ist der prozentuale Anstieg von 5 Sekunden vor Stimulation mit dem maximalen Anstieg innerhalb der ersten 15 Sekunden nach Stimulation (n=66 Zellen; $p=0,0002$; gepaarter t-Test).

Ergänzend wurde im Folgenden die ACh-Konzentration mittels HPLC in den Überständen sowie den Zellpellets bestimmt.

3.5.4 Quantitative Bestimmung der ACh-Konzentration mittels HPLC in JNC- und DRG-Neuronen sowie deren Überständen

Es wurden je 6 Zellpellets von JNC- und DRG-Neuronkulturen sowie deren Überstände in Anwesenheit von 10^{-5} M Eserin erstellt und die jeweilige ACh-Konzentration mittels HPLC gemessen. In den meisten (4/6) JNC-Zellpelletproben war ACh in einer Konzentration von 1,3-43,4 pM und in 3/6 DRG-Zellpelletproben war ACh mit einer Konzentration von 1,7-30 pM nachweisbar (Abb. 3-22). Der Mittelwert \pm SEM für Proben der JNC betrug $17,10 \pm 10,48$ pmol/2 JNC. Der Mittelwert \pm SEM für Proben der DRG betrug $6,050 \pm 4,813$ pmol/16 DRG. Die gemessenen ACh-Konzentrationen in den Zellen von DRG und JNC zeigten keinen signifikanten ($p=0,9740$; Mann-Whitney-U-Test) Unterschied.

Mittels HPLC wurde ACh in den Zellen von DRG und JNC nachgewiesen. Im Gegensatz dazu wurde in allen Überständen kein ACh nachgewiesen.

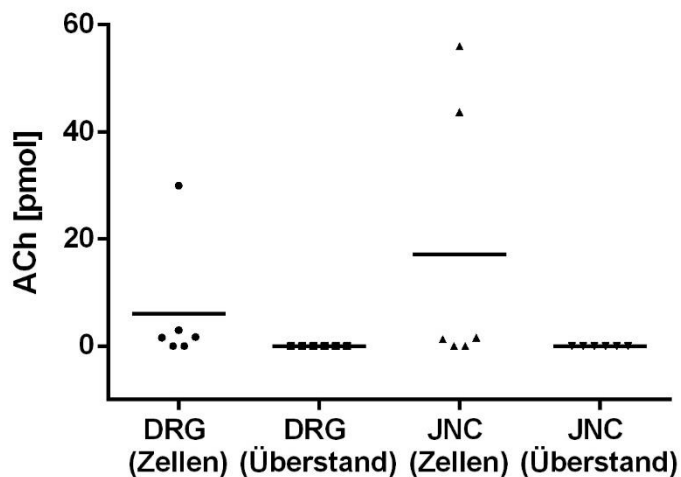


Abb. 3-22: Mittels HPLC gemessene ACh-Konzentrationen in Überständen von DRG und JNC. Gemessen wurden Proben von $n=6$ JNCs (je 2 Ganglien) und $n=6$ DRGs (je ca. 16 Ganglien). Im Durchschnitt betrug die ACh-Konzentration in den JNC-Zellpellets: $17,10 \pm 10,48$ pmol/2 JNC-Ganglien und $6,050 \pm 4,813$ pmol/16 DRG-Ganglien; kein signifikanter Unterschied zwischen JNC und DRG ($p=0,9740$; Mann-Whitney-U-Test). In allen Überständen von DRG und JNC wurde kein ACh nachgewiesen.

3.6 Parasympathische Neurone als Quelle einer ACh-Freisetzung

RT-PCR-Ergebnisse

Parasympathische Neurone des Ggl. pterygopalatinum wurden präpariert und die mRNA-Expression von CTLs, CHT1 und ChAT der cholinergen Neurone als Positivkontrolle untersucht.

Durch *single-cell*-RT-PCR wurden 9 parasympathische Neurone auf CTL1-5-, CHT1- und ChAT-mRNA Expression untersucht (Abb. 3-23). Bei einem Drittel der untersuchten Zellen wurde CTL1-mRNA und bei 2 von 9 Neuronen CTL2 nachgewiesen. Vereinzelt, mit 2 von 9 Neuronen, konnte eine ChAT-mRNA Expression gezeigt werden. Bei 5 von 9 Neuronen wurde CHT1-mRNA nachgewiesen. Die Gelelektrophorese der PCR-Produkte zeigt bei CHT1 und ChAT vereinzelt Primerdimere mit Banden <100 bp. Die zu erwartenden Banden wären bei 163 bp (ChAT) und 174 bp (CHT1) gewesen.

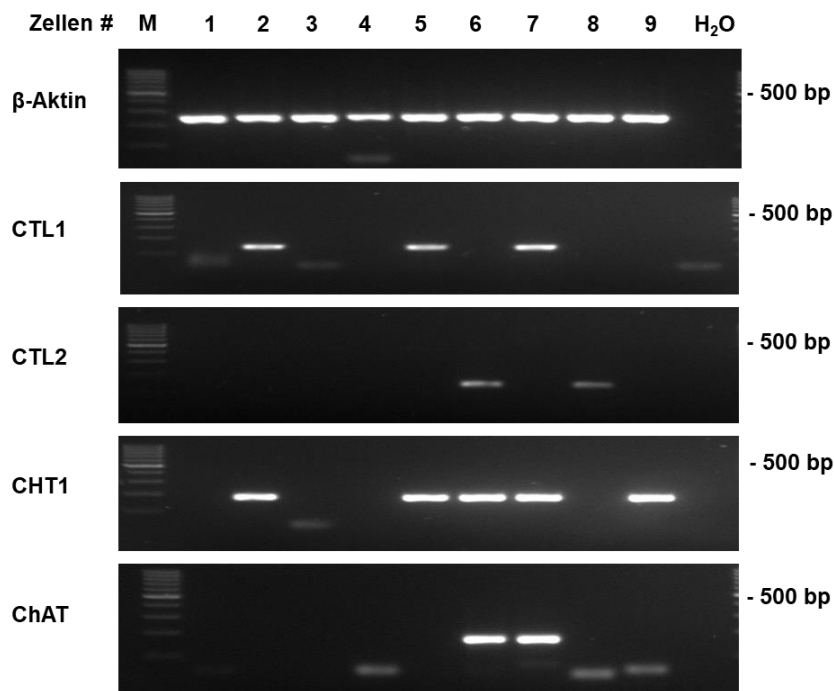


Abb. 3-23: mRNA-Expression von CTL1-2, CHT1 und ChAT sowie β -Aktin in isolierten Neuronen des Ggl. pterygopalatinum.

Gelelektrophorese von PCR-Produkten in einem 2%igem Agarose-Gel mit Ethidiumbromid. n=9 Zellen (#1-9); RT-PCR-Ergebnisse von 9 isolierten parasympathischen Neuronen. Untersucht wurde auf mRNA-Expression für CTL1-5, CHT1 und ChAT. CTL1-mRNA war bei 33%; CTL2-mRNA bei 22%, ChAT war bei 22% und CHT-1-mRNA war bei 55% der Neurone nachweisbar. M = 100 bp-Marker, „dickere“ Bande entspricht 500 bp. H₂O = Wasserkontrolle. Erwartete Amplikongröße: β -Aktin (249 bp); CTL1 (140 bp); CTL2 (126 bp); CHT1 (174 bp); ChAT (163 bp).

Wirkung von Überständen parasympathischer Neurone (Ganglion pterygopalatinum) auf mAChR3-Reporterzellen im Ca²⁺-Imaging

Im Ca²⁺-Imaging wurden Reporterzellen analysiert, die mit Überständen von parasympathischen Neuronen, zehn Minuten mit 10 µM Eserin in Medium bei 37 °C inkubiert, stimuliert wurden. Im Ca²⁺-Imaging zeigte sich keine Reaktion auf die Applikation des Überstandes parasympathischer Neurone nach Eserinapplikation (Abb. 3-24).

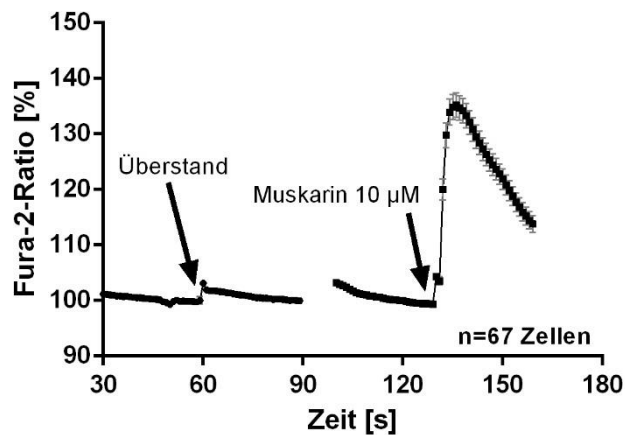


Abb. 3-24: **Keine Reaktion von mAChR3-Reporterzellen auf Überstände von parasympathischen Neuronen.**

Dargestellt ist der Mittelwert der Zellen \pm SEM eines Deckgläschen (67 Reporterzellen). Der Pfeil markiert die Gabe von 500 µl Überstand isolierter parasympathischer Neurone aus den Ggl. pterygopalatina. Alle verwendeten Zellen reagierten auf 10 µM Muskarin (Pfeilspitze) mit einem Anstieg von > 10%.

3.7 Fibroblastenzelllinie MC3T3 als Quelle einer ACh-Freisetzung

RT-PCR-Ergebnisse

Um zu untersuchen, ob Fibroblasten als potenzielle Quelle einer ACh-Freisetzung in Frage kommen, wurde die mRNA Expression von CTLs, CHT1 und ChAT in der murinen Fibroblastenzelllinie MC3T3 mittels RT-PCR untersucht. Deutlich positiv waren neben β -Aktin die Banden für CTL1-3. Schwach positiv waren die Banden für CTL5 und ChAT (Abb. 3-25).

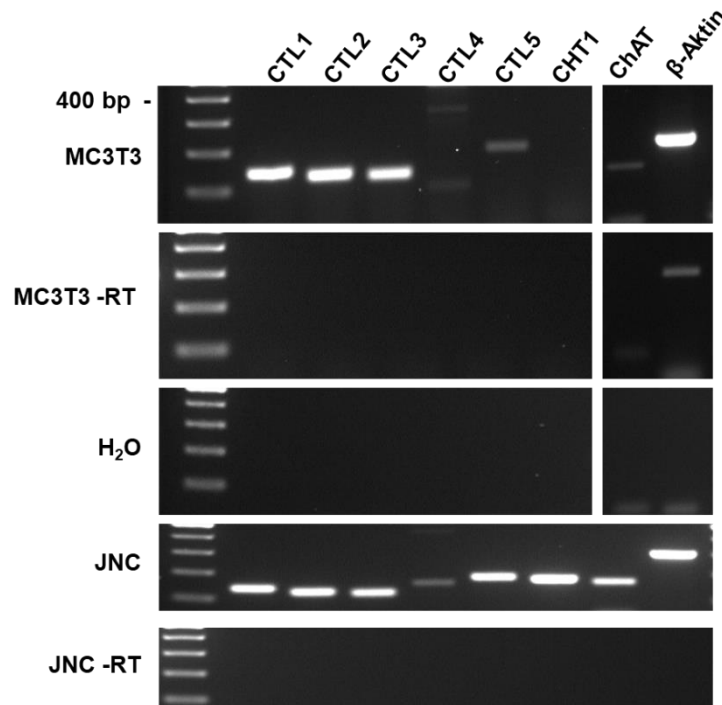


Abb. 3-25: Murine Fibroblastenzelllinie MC3T3 exprimiert mRNA für CTLs und ChAT.

RT-PCR, Gelelektrophorese in einem 2%igem Agarose-Gel. Zellen aus einer Kulturflasche (75 cm²); n=1. Die RT-PCR-Produkte zeigen mRNA für CTL1-5, ChAT und β -Aktin. CHT1-mRNA wurde nicht nachgewiesen. MC3T3 -RT = -RT-Kontrolle; H₂O = Wasserkontrolle; JNC = Positivkontrolle; JNC -RT = -RT der Positivkontrolle. M= 100 bp-Marker. Erwartete Amplikongröße: CTL1 (140 bp); CTL2 (126 bp); CTL3 (122 bp); CTL4 (155 bp); CTL5 (180 bp); CHT1 (174 bp); ChAT (163 bp); β -Aktin (249 bp).

Wirkung von Überständen der Fibroblastenzelllinie MC3T3 auf mAChR3-Reporterzellen im Ca²⁺-Imaging

Das Medium eines dicht bewachsenen Monolayers der Fibroblastenzelllinie MC3T3 wurde abgenommen, durch Locke-Puffer mit 10 µM Eserin ersetzt und für 10 min bei 37 °C inkubiert. Die Stimulation mit 500 µl des abgenommenen Überstandes führte bei mAChR3-Reporterzellen im Calciumimaging zu keiner Reaktion (Abb. 3-26).

Die Fibroblasten besitzen mRNA für cholinerge Transporter sowie für die ChAT und könnten damit als Quelle einer ACh-Freisetzung in Frage kommen. Im Calciumimaging, als indirekte Nachweismethode, zeigte sich kein Hinweis auf eine ACh-Freisetzung.

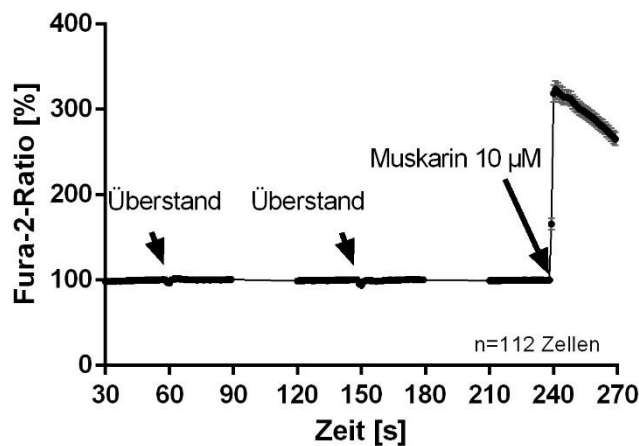


Abb. 3-26: Überstand der Fibroblastenzelllinie MC3T3 führt zu keiner nachweisbare Reaktion von mAChR3-Reporterzellen im Ca²⁺-Imaging.

Dargestellt ist der Mittelwert der Reporterzellen eines Deckgläschens. In die Auswertung eingegangen sind 112 Reporterzellen, die entweder auf den Überstand oder auf 10 µM Muskarin, den Kontrollstimulus, mit einem Anstieg > 10 % der Baseline reagierten.

3.8 Alveolarmakrophagen als Quelle einer ACh-Freisetzung

Um zu untersuchen, ob Alveolarmakrophagen für eine ACh-Freisetzung in Frage kommen, wurden mittels BAL Zellen der Atemwege gewonnen und auf eine mRNA-Expression von CTLs, CHT1 und ChAT untersucht. Dabei wurde je ein Volumen von 0,25 ml - 1,45 ml aus dem Atemweg der Maus mit einem Zellgehalt von $0,65 \times 10^3$ - $0,76 \times 10^5$ Zellen/250 μ l, aspiriert. Zur Auswertung der Zellzusammensetzung wurde ein Zytospot der BAL auf einen Objektträger überführt und mittels Pappenheim-Färbung gefärbt. Mittels Neubauer-Zählkammer wurde die Zellzahl ermittelt. In der BAL waren verschiedene Zelltypen (Epithelien, Alveolarmakrophagen, Lymphozyten u.a.) nachweisbar (Abb. 3-27). Aus 4 BAL wurden 2718 Zellen ausgezählt. 98,45 % der Zellen waren Alveolarmakrophagen, 1,25 % waren Epithelzellen und 0,29 % waren neutrophile Granulozyten.

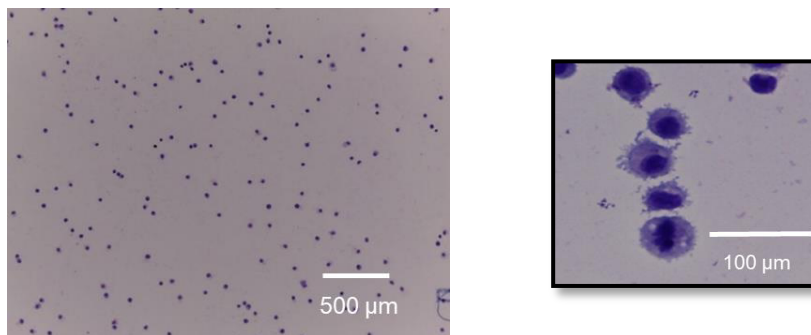


Abb. 3-27: **Bild eines Zytospot einer BAL mit gut erkennbaren Zellen.**

Gefärbt wurde mit der Pappenheim-Färbung. Der gerahmte Abschnitt (rechtes Bild) zeigt gefärbte Alveolarmakrophagen.

RT-PCR

Die BALs wurden mittels RT-PCR auf eine mRNA-Expression von CTL-, CHT1- und ChAT-mRNA untersucht (Abb. 3-28). CTL1- und CTL2-mRNA waren bei 5/5 Proben nachweisbar und CTL3- und CTL4-mRNA waren bei 4/5 nachweisbar. mRNA von CTL5 und ChAT waren nur in je 1/5 Proben nachweisbar.

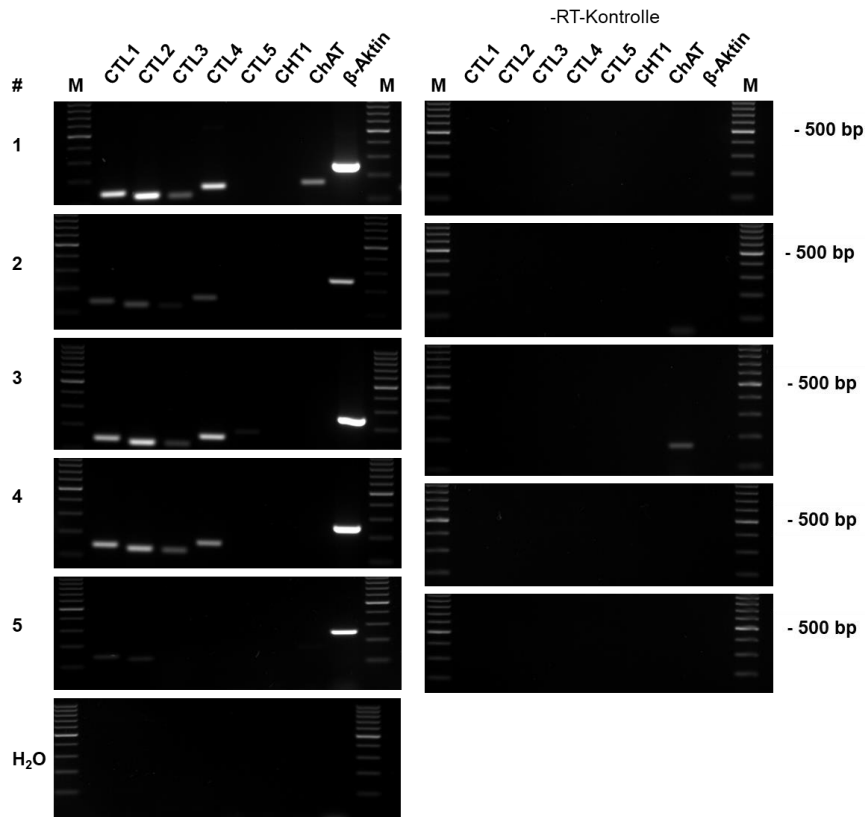


Abb. 3-28: BAL, mRNA-Expression von CTL, CHT1, ChAT und β-Aktin.

Dargestellt sind die Ergebnisse einer Gelelektrophorese der PCR-Produkte in einem 2%igem Agarose-Gel. Bei n=5 Mäusen (#1-5) wurde eine BAL durchgeführt. Gezeigt sind die PCR-Ergebnisse der 5 BALs. Auf der rechten Seite ist die -RT-Kontrolle der jeweiligen Probe dargestellt. Unten ist die Wasserkontrolle (H₂O) dargestellt. M = 100 bp-Marker; die kräftigere Markerbande markiert 500 bp. Erwartete Amplikongröße: CTL1 (140 bp); CTL2 (126 bp); CTL3 (122 bp); CTL4 (155 bp); CTL5 (180 bp); CHT1 (174 bp); ChAT (163 bp); β-Aktin (249 bp).

3.9 Mastzellen als Quelle einer ACh-Freisetzung

Um zu untersuchen, ob Mastzellen als Quelle der (nq)ACh-Freisetzung in Frage kommen könnten, wurden Organbadversuche mit KitWSh- (mastzell-defizienten Mäusen) und Kontrolltieren (B6-Cg-Tg(Wnt1-Cre)11Rth Tg(Wnt1-GAL4)11Rth/J) durchgeführt.

Histologie

Vergleicht man das Gewebe, hier Dünndarmabschnitte, von Wildtyptieren mit KitWSh-Mäusen, konnte das Fehlen von Mastzellen in den Knock-out-Tieren beobachtet werden (Abb. 3-29).

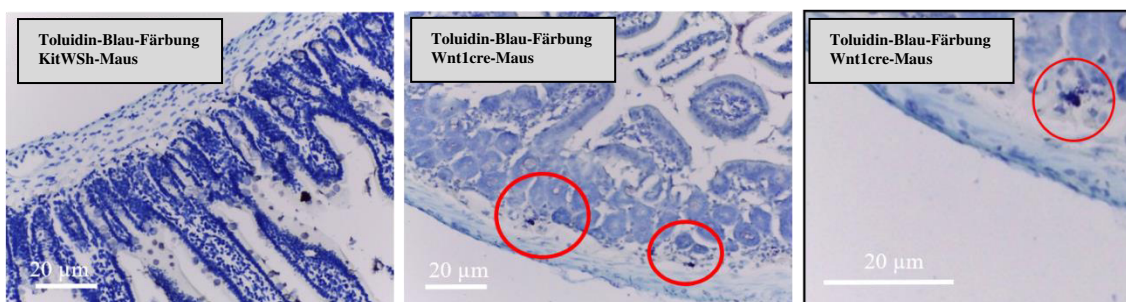


Abb. 3-29: **Histologische Färbung von Dünndarmanschnitten von KitWSh-Mäusen und Wnt1cre-Mäusen.**

Keine Mastzellen in der Tunica submucosa der KitWSh-Mäuse vorhanden. Im Wnt1cre-Präparat sind Mastzellen (rot umkreist) sichtbar.

Organbadversuche

Analog zu den Versuchen von Nassenstein et al. (2015) wurden die unteren 5 Trachealringe von Wnt1cre- und Mastzell-defizienten Mäusen (KitWSh) für die Organbadversuche verwendet. Nach einer elektrischen Feldstimulation (EFS, 10 V, 150 mA für 2 ms, 10 Hz, 5 min Pause zwischen den Stimulationen von je 1 min) zur Überprüfung der Vitalität der Trachealabschnitte erfolgte eine Zugabe von 10 µM Eserin (Abb. 3-30). Im Anschluss an die Kontraktionszunahme erfolgt eine erneute EFS und eine Stimulation mit 10⁻⁶ M Muskarin (Abb. 3-30).

In Bezug auf die Kraftzunahme nach 3 min gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen Wnt1cre- und Mastzell-defizienten Mäusen. Nach 11 min war die Kraftzunahme der Trachealsegmente bei den KitWSh-Tieren signifikant höher als die der Kontrolltiere (p=0,0159, Mann-Whitney-U-Test).

Die Reaktion der mastzell-defizienten Mäuse zeigte keinen verringerten Effekt, wie er bei einer ACh-Freisetzung durch Mastzellen zu erwarten gewesen wäre, sondern eine gesteigerte Trachealkontraktion. Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass Mastzellen unter den Versuchsbedingungen nicht ACh freisetzen.

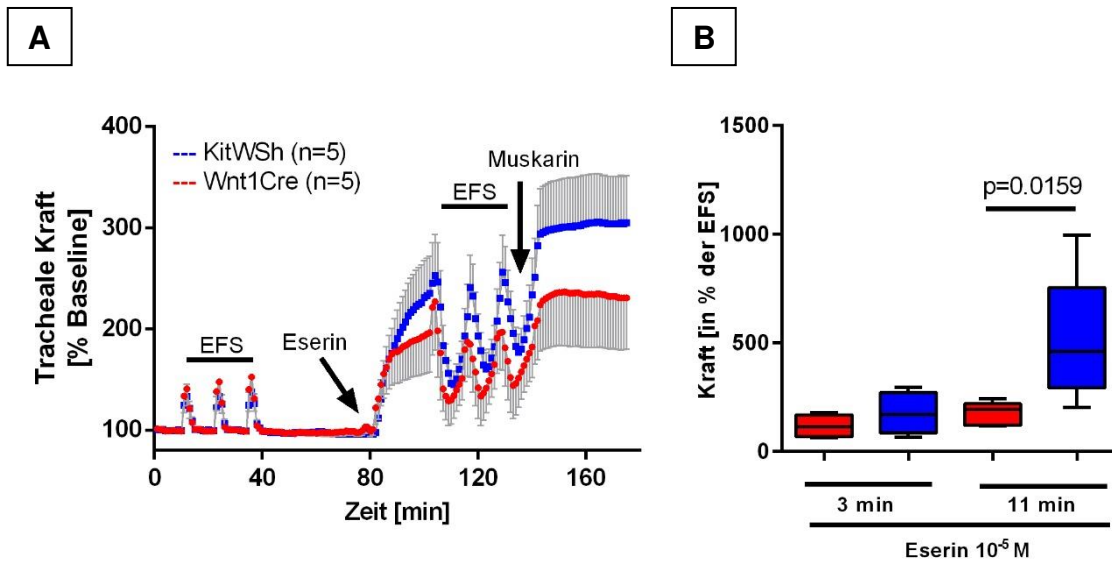


Abb. 3-30: **Tracheale Kraftzunahme mastzell-defizienter Mäuse.**

A: Die Grafik zeigt tracheale Kraftzunahme [% Baseline] im Organbad von KitWSh-Mäusen und Wnt1Cre-Mäusen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus je n=5 Trachealabschnitten. Dreiecke = KitWSh-Mäuse; Kreise = Wnt1Cre-Mäuse. EFS vor und nach Eseringabe zur Vitalitätskontrolle. **B:** Auswertung der Organbadversuche mit mastzell-defizienten Mäusen mittels Boxplots 3 und 11 min nach Eserinapplikation. Nach 11 min zeigt sich ein signifikanter Unterschied ($p=0,0159$, Mann-Whitney-U-Test).

3.10 Trachealepithel als Quelle einer ACh-Freisetzung

RT-PCR

Um zu untersuchen, ob Trachealepithel mRNA für CTLs, CHT1 und ChAT exprimiert, wurde dieses mittels RT-PCR untersucht. Die Tracheen von 6 Mäusen wurden entnommen. Durch mechanisches Lösen mittels Zellschratcher wurde das Epithel entfernt. Dieses wurde aufgefangen und für die RT-PCR verwendet. ChAT war bei 6 von 6 Proben und CHT1 bei 2 von 6 Proben nachweisbar (Abb. 3-31). Aus anderen Studien ist bekannt, dass CTL 1-5-mRNA in der Mehrheit des untersuchten Proben exprimiert war (Nassenstein et al. 2015).

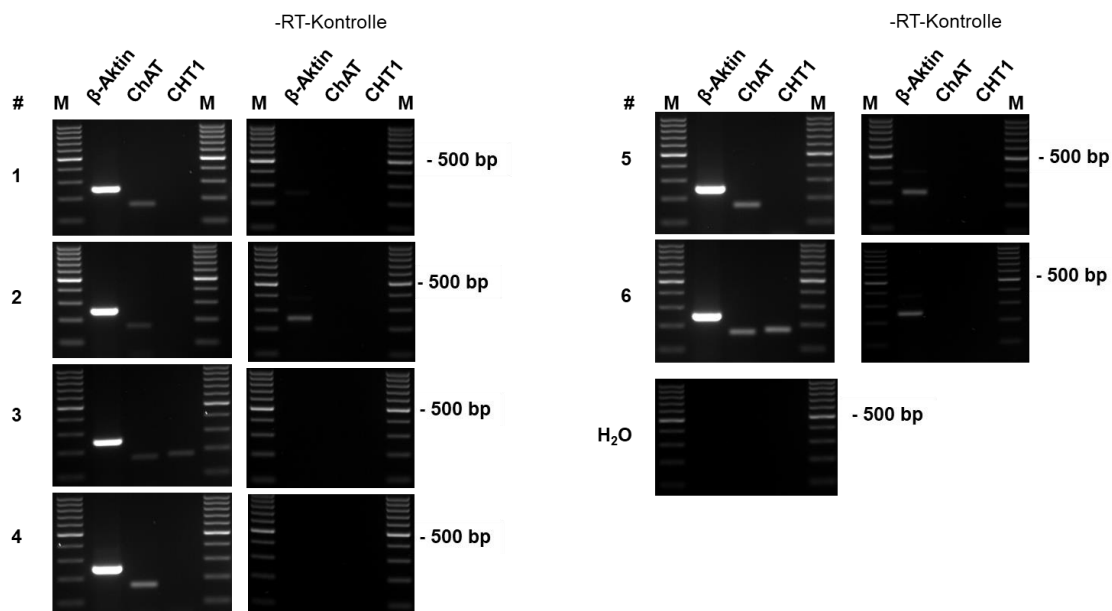


Abb. 3-31: mRNA-Expression von ChAT und CHT1 in mechanisch isoliertem Trachealepithel.

RT-PCR, Gelelektrophorese der PCR-Produkte in einem 2%igem Agarose-Gel. n=5 murine Tracheen (# 1-5) Verwendet wurden intron-spannende Primer. Die Abbildung zeigt die mRNA-Expression von CHT1 in 2 von 6 Trachealabschnitten und ChAT in 6 von 6 Proben. Auf der rechten Seite ist die -RT-Kontrolle der jeweiligen Probe dargestellt. Rechts unten ist die Wasserkontrolle (H₂O) dargestellt. M = 100 bp-Marker; die kräftigere Markerbande markiert 500 bp. Erwartete Amplikongröße: β -Aktin (249 bp); ChAT (163 bp); CHT1 (174 bp).

Wirkung von f-MKKFRW auf die ACh-Freisetzung

In Kooperation mit Alexander Perniss wurden von 11 Tieren Tracheen explantiert und mit f-MKKFRW oder Vehikel stimuliert. Die Tracheen wurden für 15 min mit Zellmedium inkubiert und darauffolgend das Medium entnommen. Anschließend wurde erneut Medium mit 10 μ M f-MKKFRW appliziert und nach weiteren 15 min entnommen. Mit den Überständen wurden mAChR3-Reporterzellen stimuliert und die Zellreaktion im Ca^{2+} -Imaging gemessen (Abb. 3-32).

Der Anstieg in % Baseline der gemessenen Reaktion im Ca^{2+} -Imaging von Überstand ohne f-MKKFRW ($p=0,0002$; gepaarter t-Test) war signifikant (Abb. 3-32). Der Anstieg in % Baseline nach Stimulation mit Überstand mit f-MKKFRW ($p<0,0001$; gepaarter t-Test) war ebenfalls signifikant. Der Anstieg der Zellreaktion der Reporterzellen im Ca^{2+} -Imaging war nach Stimulation mit Überstand mit f-MKKFRW signifikant höher als der Anstieg nach Stimulation mit Überstand ohne f-MKKFRW ($p=0,0003$, ungepaarter t-Test) (Abb. 3-32).

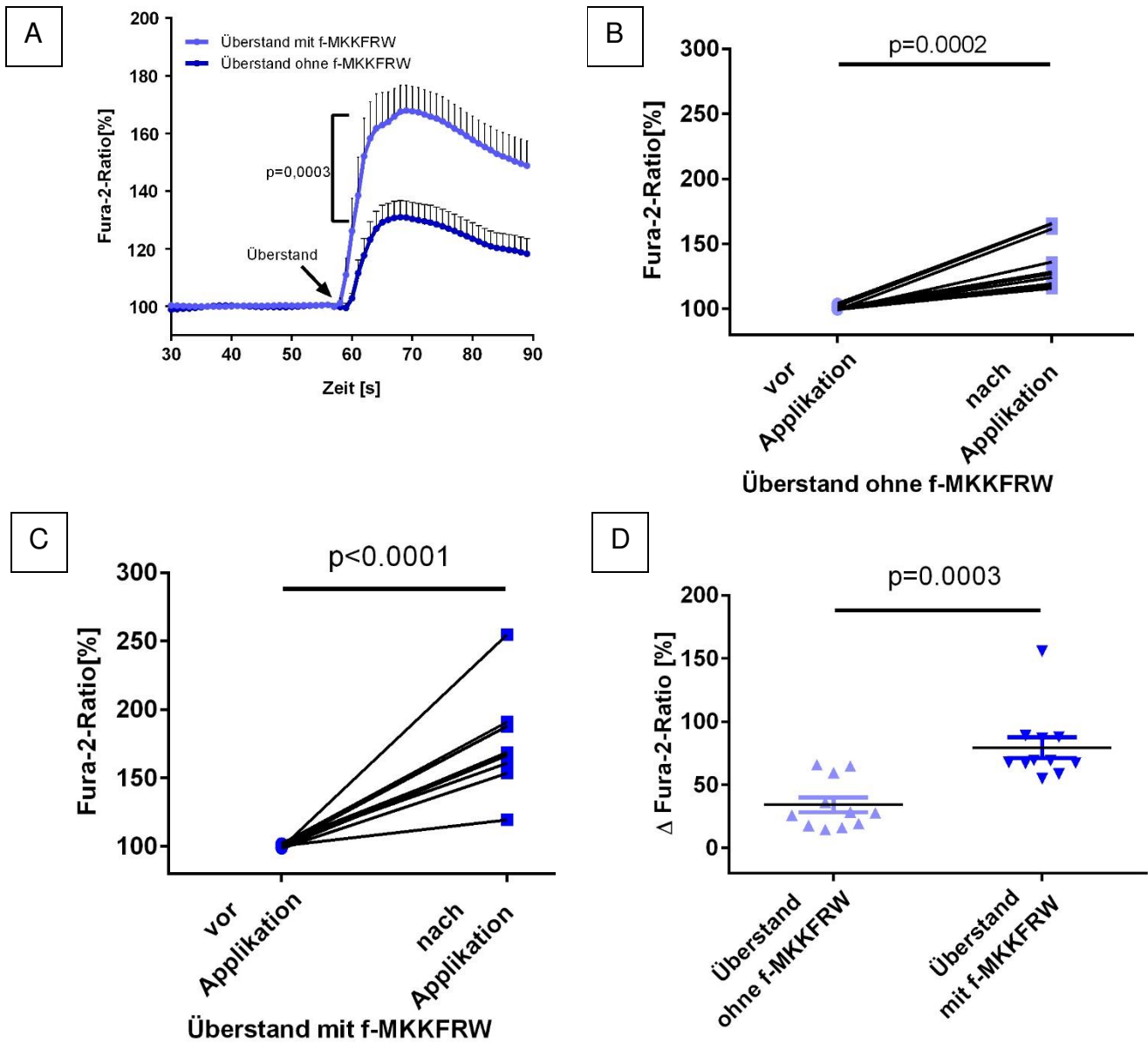


Abb. 3-32 **A:** Reaktion von mAChR3-Reporterzellen im Ca^{2+} -Imaging auf Überstand von isolierten Tracheen mit und ohne f-MKKFRW.

Dargestellt ist die Zellreaktion von mAChR3-Reporterzellen auf Überstand mit f-MKKFRW (n=11; 586 Reporterzellen) und ohne f-MKKFRW (n=11; 596 Reporterzellen). Alle eingeschlossenen Reporterzellen reagierten auf den Stimulus mit einem Anstieg $>10\%$. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Applikation des Stimulus (Überstand +/- f-MKKFRW). Der Anstieg nach Stimulation mit Überstand mit f-MKKFRW ist signifikant höher als der Anstieg nach dem Kontrollstimulus ($p=0,0003$, ungepaarter t-Test).

B-D: Statistische Auswertung der Reaktion von mAChR3-Reporterzellen auf Überstand von isoliertem Trachealepithel. Verglichen ist der Anstieg ausgehend 5 s vor Stimulation (unstimuliert) mit dem Maximum innerhalb der ersten 15 s nach Stimulation **B:** Applikation von Überstand ohne f-MKKFRW (=Kontrolle)) und **C:** Applikation von Überstand mit f-MKKFRW. **D:** Die Abbildung zeigt den Anstieg in % Baseline nach Applikation der Kontrolle und den Anstieg in % Baseline nach Applikation des Überstandes nach f-MKKFRW Stimulation. Der Anstieg nach Stimulation mit Überstand mit f-MKKFRW-Behandlung ist signifikant höher ($p=0,0003$; ungepaarter t-Test).

Um zu prüfen, ob die Reaktion der Reporterzellen mAChR-vermittelt und daher wahrscheinlich durch ACh ausgelöst wurde, wurde dem Überstand mit f-MKKFRW Atropin appliziert. Verglichen wurden die Anstiege im Ca²⁺-Imaging nach Stimulation mit den Überständen (f-MKKFRW) und (f-MKKFRW + Atropin). Der Anstieg nach Stimulation mit Überstand nach Gabe von f-MKKFRW war signifikant höher ($p < 0,0001$; ungepaarter t-Test). Nach Applikation von Atropin kam es zu keiner signifikanten Reaktion ($p = 0,4585$; gepaarter t-Test) (Abb. 3-33).

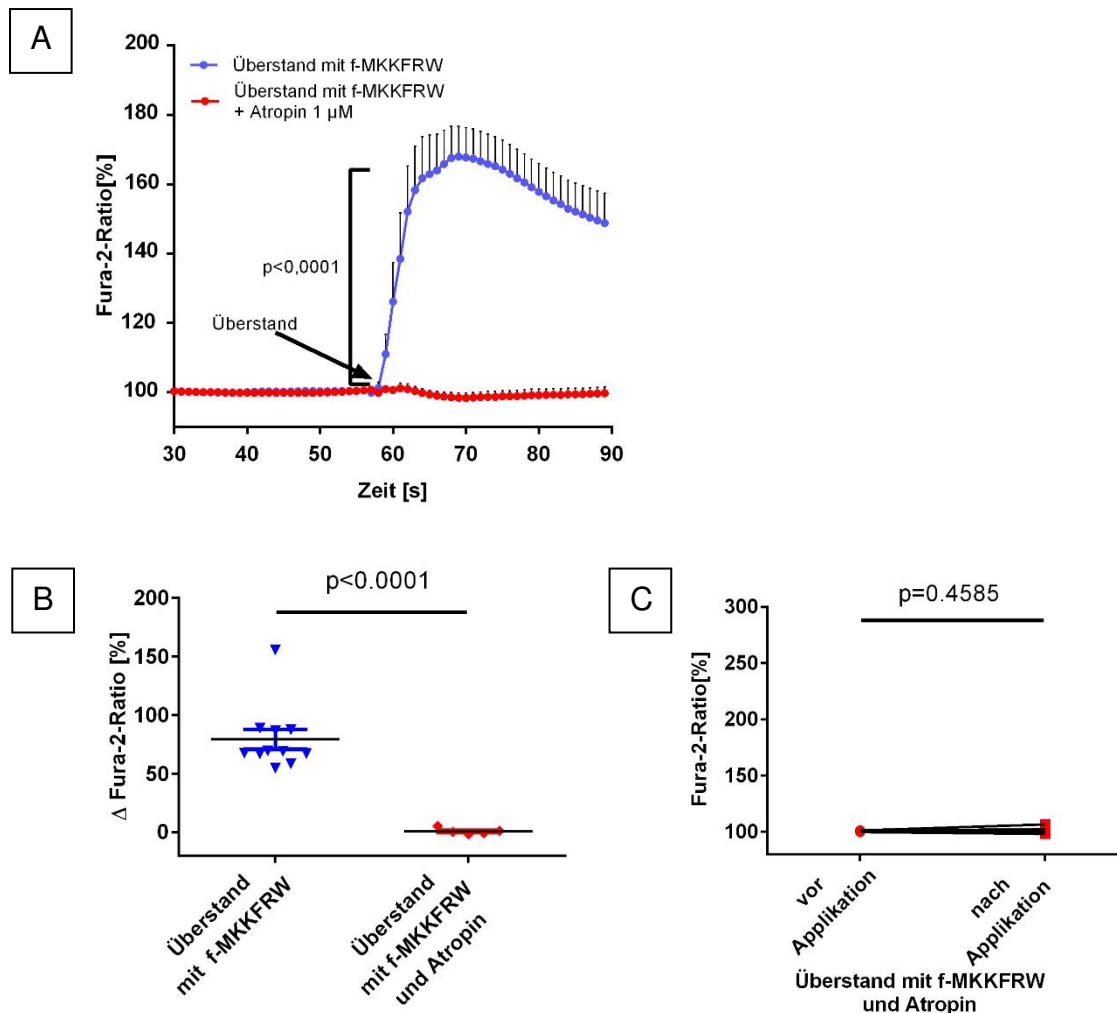


Abb. 3-33: Atropin inhibiert die Reaktion von mAChR3-Reporterzellen im Ca²⁺-Imaging auf Überstand von isolierten Tracheen.

A: In der Grafik dargestellt sind die Mittelwerte der Mittelwerte der Reporterzellen auf Deckgläschen: f-MKKFRW (n=11; 586 Reporterzellen) und nach Atropingabe (n=5; 135 Reporterzellen). Alle eingeschlossenen Reporterzellen haben mindestens auf den Stimulus oder auf die Positivkontrolle (ACh 10⁻⁶M) mit einem Anstieg >10% reagiert. **B:** Verglichen ist der Anstieg ausgehend von Sekunde 55 vor Stimulation mit dem Maximum 15 s nach Stimulation. Verglichen ist der Anstieg in % Baseline Überstand (f-MKKFRW) mit Überstand (f-MKKFRW + Atropin); $p < 0,0001$; ungepaarter t-Test. **C:** Verglichen ist der Anstieg ausgehend von Sekunde 55 vor Atropingabe mit dem Maximum 15 s nach Atropingabe. Verglichen ist der Anstieg in % Baseline ($p = 0,4548$; gepaarter t-Test).

Um eine tracheale ACh-Freisetzung zu quantifizieren, wurden *high performance liquid chromatography* (HPLC)-Messungen von trachealen Überständen durchgeführt. Zu Beginn wurden die Tracheen in Medium mit Eserin inkubiert. Die Überstände wurden abgenommen und anschließend wurde dem Medium 10 μM f-MKKFRW hinzugegeben und die Tracheen erneut inkubiert. Im Durchschnitt befanden sich in den Überständen der unstimulierten Tracheen $52,3 \pm 14,13$ nM ACh. Nach Stimulation mit 10 μM f-MKKFRW wurden $110,0 \pm 33,65$ nM ACh in den Überständen gemessen (Abb. 3-34). Es lag eine signifikante Zunahme ($p=0,0374$; gepaarter t-Test) der ACh-Freisetzung nach Stimulation mit f-MKKFRW vor.

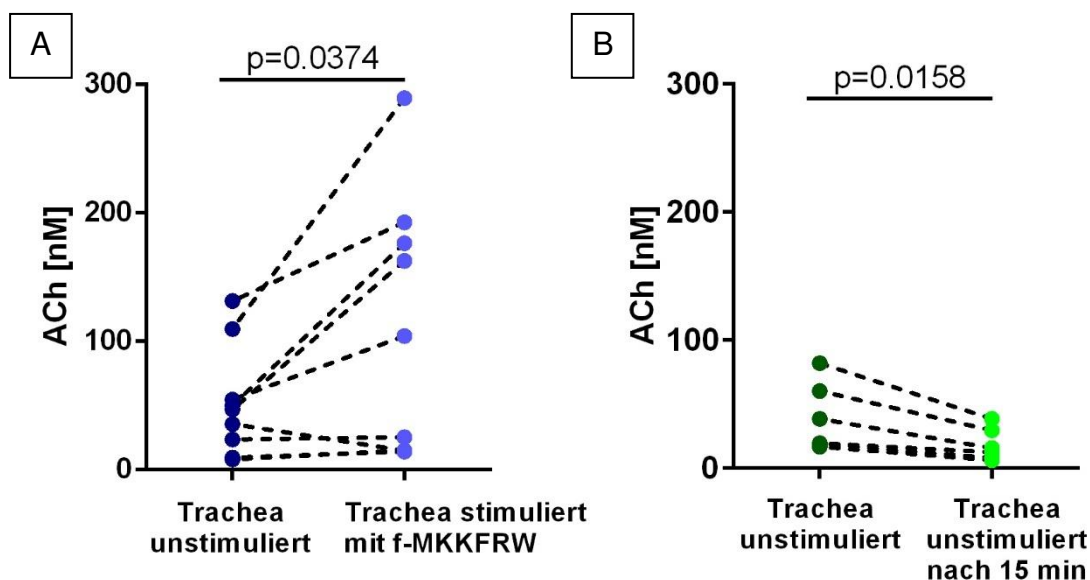


Abb. 3-34: **Steigerung der ACh-Freisetzung durch Stimulation mit f-MKKFRW.**

A: In der Grafik dargestellt sind die ACh-Konzentrationen im Überstand von 9 murinen Trachealabschnitten vor und nach Stimulation. Trachea unstimuliert: Medium mit 10 μM Eserin; Trachea stimuliert: Medium mit 10 μM Eserin und 10 μM f-MKKFRW ($p=0,0374$; gepaarter t-Test).

B: In der Grafik dargestellt sind die ACh-Konzentrationen im Überstand von 9 murinen Trachealabschnitten vor und nach Stimulation. Trachea unstimuliert: Medium mit 10 μM Eserin; Trachea unstimuliert: Medium mit 10 μM Eserin ($p=0,0158$; gepaarter t-Test).

Fasst man die Ergebnisse aus den oben genannten Versuchen zusammen, so zeigt sich eine ACh-Freisetzung aus unstimulierten Tracheen, die durch die Applikation von 10 μM f-MKKFRW deutlich auf das 2,27-fache gesteigert werden konnten (Abb. 3-34). Der beobachtete Effekt von trachealem Überstand auf Reporterzellen war durch Atropin inhibierbar. Abschließend lässt sich zeigen, dass das Trachealepithel Quelle einer ACh-Freisetzung ist. Die Freisetzung ist durch f-MKKFRW stimulierbar.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

1. Welche Zelltypen der murinen Atemwege exprimieren CTLs, CHT1 und ChAT und kommen daher für eine (nq)ACh-Freisetzung oder ACh-Synthese in Frage?
2. Ist eine nqACh-Freisetzung aus verschiedenen Geweben in den Atemwegen funktionell nachweisbar und kann diese reguliert werden?

Verwendet wurden hierfür die RT-PCR mit Nachweis von CTL-, CHT1-, und ChAT-mRNA in u.a. isolierten Neuronen und Trachealepithel, das Organbad mit Nachweis einer trachealen Kontraktionszunahme nach Eseringabe, die HPLC mit Nachweis einer stimulierbaren ACh-Freisetzung aus Trachealepithel und die Biosensor-Technik mittels Ca^{2+} -Imaging mit Nachweis einer Zellantwort auf tracheale Überstände aus Organbadversuchen und auf Überstände stimulierter Trachealabschnitte. Des Weiteren wurden Immunfluoreszenzaufnahmen von Neuronen sowie Lunge und Trachea angefertigt. Zusammenfassend sprechen die Ergebnisse dafür, dass ACh von unterschiedlichen Zellpopulationen in den Atemwegen von Mäusen gebildet wird, wie Chemosensorische Zellen des Atemwegsepithel, sensorische Neurone aus JNC, Alveolarmakrophagen und Fibroblasten.

4.1 Die Methode: Ca^{2+} -Imaging mit Reporterzellen

Zur Bearbeitung der oben genannten Fragestellung wurden unterschiedliche, oben aufgeführte, experimentelle Methoden verwendet. Eine intensiv genutzte Methode zur Bearbeitung der genannten Aspekte war das Ca^{2+} -Imaging mit Reporterzellen. Das Biosensor-System der Reporterzellen beschränkt sich hauptsächlich auf die qualitative Bestimmung von ACh. Die gemessene Zellantwort spiegelt nicht ausschließlich die extrazelluläre ACh-Konzentration wider, denn in Abhängigkeit individueller zellulärer Signalkomponenten führt eine vermehrte Rezeptoraktivierung und $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Konzentrationszunahme zu Desensibilisierung und einer Ca^{2+} -Erschöpfung. Ein absoluter quantitativer Vergleich verschiedener Experimente ist durch die unterschiedliche Sensitivität individueller Reporterzellen nicht möglich (Rodriguez-Diaz et al. 2012). Trotz dieser Einschränkung kann das Biosensor-System der Reporterzellen Informationen über den sekretorischen Phänotyp verschiedener Zellen geben (Rodriguez-Diaz et al. 2012). In dieser Arbeit wurde Atropin (10 μM) als Antagonist der mAChR als Kontrolle verwendet.

Um ein Verständnis dieses Biosensor-Systems zu erlangen sowie die Sensitivität dieses Systems zu messen, führten wir zur Validierung Stimulationen mit ACh unterschiedlicher Konzentrationen durch. Bereits ab einer ACh-Konzentration von 1 pM zeigte sich eine deutliche Stimulierbarkeit der Reporterzellen. Unter 1 pM kam es zu keiner signifikanten bzw. sicher reproduzierbaren Zellantwort. Dieser Wert ist für die Interpretation der Ergebnisse aus Ca^{2+} -Messungen wichtig, denn eine fehlende Zellreaktion nach Stimulation mit einem Überstand kann sowohl durch das Fehlen von ACh im Überstand bedingt sein als auch bedeuten, dass ACh in zu geringer Konzentration vorliegt. Die Stimulation von mAChR mit ACh konnte durch Atropin inhibiert werden. Zudem war die Reaktion der Reporterzellen nach wiederholter Stimulation mit demselben Stimulus (Kapitel 3.1.1) von Interesse. Diese Vorversuche waren für die Planung und Durchführung nachfolgender Experimente von Bedeutung. Bei Rodriguez-Diaz et al. (2011) zeigte sich unabhängig von vorhandenem Gewebe eine direkte Stimulierbarkeit der Reporterzellen mit 10 μM ACh. Die beobachtete Reporterzellantwort konnte durch 5 μM Atropin inhibiert werden (Rodriguez-Diaz et al. 2011).

Bei den in der Arbeit beschriebenen Versuchen (Kapitel 3.2) wurden die Reporterzellen für 60 s stimuliert und anschließend für 2 min gewaschen. Bis zum nächsten Stimulus vergingen insgesamt 3 min. Eine repetitive Stimulation mit demselben Stimulus führte auch hier, vergleichbar mit den Beobachtungen von Koenig und Edwardson (Koenig und Edwardson 1997; Koenig und Edwardson 1996), zu einer raschen Abnahme, einer Desensibilisierung, des *Anstieges % Baseline* im Ca^{2+} -Imaging, zum Teil bereits ab der 2. Stimulation. Es zeigte sich in eigenen Versuchen, je höher die Konzentration des Agonisten, desto schneller kam es zu einer Abnahme. Als Ursache dafür könnte diskutiert werden, dass agonistische Stimulation G-Protein-gekoppelter Rezeptoren zu einer Reorganisation der Rezeptoren an der Zelloberfläche führt. Durch die Stimulation wird zugleich eine Internalisierung bzw. Endozytose entsprechender Rezeptoren getriggert (Koenig und Edwardson 1997). Die Internalisation G-Protein-gekoppelter Rezeptoren nach Stimulation mit Agonisten, wie Carbachol, Strukturanalogon des ACh, wurde in SH-SY5Y-Zellen gemessen. Die Menge an Oberflächenrezeptoren wurde anschließend durch Bindung von [^3H]-N-Methyl-scopolamin bestimmt. Bereits innerhalb der ersten Minuten nach Stimulation kam es zu einem exponentiellen Abfall der oberflächlichen Rezeptordichte (Koenig und Edwardson 1996).

Überstände sowohl von isolierten Zellpopulationen, Zelllinien oder aus dem Organbad wurden wiederholt auf Reporterzellen gegeben. Durch die Überstände aus Organbadversuchen nach Eserin-Applikation konnte eine signifikante Reporterzellantwort, die durch Atropin inhibierbar war, hervorgerufen werden.

Damit ist die Biosensor-Technik eine sensitive Technik, um ACh nachzuweisen, die allerdings deutliche Limitationen aufweist. Ist ACh in ausreichendem Maße in dem Überstand bzw. dem Stimulus vorhanden, so reagieren alle Reporterzellen mit einer deutlichen $[Ca^{2+}]_i$ -Zunahme. Im Bereich kleinster Menge von ACh (vgl. Abb. 3-2, Konzentrationskurve) ist eine hohe Varianz in der Antwort einzelner Zellen sichtbar. Diese scheint nicht allein von der Konzentration im Überstand abhängig, sondern auch von der Reaktionsfähigkeit der Zelle selbst zu sein, die z.B. negativ beeinflusst wird, je länger die Zellen bereits auf Deckgläschen ausgesät sind oder je häufiger eine Stimulation der Zellen durchgeführt wurde. Weitere Experimente und Kontrollen sind notwendig, wie z.B. die Hemmung der Zellreaktion durch Atropin, um eine Aussage über das Vorhandensein von ACh im Zellüberstand treffen zu können. ACh kann somit rein qualitativ nachgewiesen werden und somit eine Aussage über den sekretorischen Phänotyp einer Zelle getroffen werden. Zum quantitativen Nachweis eignet sich die Methode nur bedingt. Daher sind zusätzliche Techniken, z.B. HPLC-Messungen erforderlich, um Aussagen über die absolute Konzentration im Überständen treffen zu können.

4.1.2 Applikation von Überständen im Ca^{2+} -Imaging

Im Ca^{2+} -Imaging wurden vor allem Reporterzellen stimuliert und gemessen. Die Applikation des Überstandes (Stimulus) zu den Reporterzellen ist technisch anspruchsvoll. Unterschiedliche Pipettiermöglichkeiten, unterschiedliche Mengen an Überstand, die unterschiedliche Endkonzentration an ACh im Überstand bzw. Medium, sowie Art der Zugabe können das Ergebnis beeinflussen. Ziel war eine Optimierung und Standardisierung der Applikation. Die Applikation des Stimulus mittels Pipette direkt in das Medium der Zellen bei abgeschalteter Umwälzpumpe zeigte sich als sinnvoll, da ein sofortiges Herauswaschen der Substanz aus der Kammer deutlich minimiert wurde. Durch die Applikation in das Medium kam es zu einer Vermischung von Stimulus und Medium und die Zellen wurden gleichmäßig stimuliert.

Um die Menge an ACh im Überstand zu erhöhen, wurde versucht, dies mit geringeren Volumina an Medium mit Eserin zu erreichen. Entsprechend dieser geringen Mengen konnte weniger Volumen auf die Reporterzellen appliziert werden, um die Endkonzentration an ACh an den Reporterzellen absolut zu erhöhen.

Mit Hilfe einer Hamilton-Glasspritze (1000 µl) und einer sehr feinen Injektionsnadel wurde versucht, den Überstand mittig auf die Zellen auf dem Deckgläschen zu pipettieren. Diese Methode erwies sich als nicht reproduzierbar, da bereits kleinste Bewegungen zu einer Berührung des Coverslips führten und sich somit Reporterzellen lösten bzw. durch eine Umpositionierung des Coverslips den Versuch unbrauchbar machten. Durch den Einbau von zwei Subkutannadeln in den Rand der Kammer, deren Nadelenden exakt mittig in der Kammer endeten, konnte der Coverslip zentral unter die Spitzen platziert werden. Der Schliff der Nadeln war nach unten gerichtet. Durch diesen Aufbau war eine bessere Applikation kleinster Mengen von Überstand auf die Reporterzellen möglich. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass für die Versuche mit kleinsten Mengen an Überstand sich die zuletzt gezeigte Kammer als umsetzbar und sich für die experimentelle Reproduzierbarkeit eignete.

4.2 Welche Zelltypen der murinen Atemwege kommen für eine ACh-Synthese in Frage?

Eine der Ausgangsfragen dieser Arbeit war, welche Zelltypen der murinen Atemwege CTLs, CHT1 und ChAT exprimieren und für eine ACh-Produktion in Frage kommen.

4.2.1 Cholin-Acetyltransferase

Der Nachweis von ChAT-mRNA in den untersuchten Zellpopulationen bzw. gepickten Zellen erfolgte mittels RT-PCR. Durch die Expression bzw. die fehlende Expression von ChAT wurde auf diesem Wege eine Voraussetzung für eine potenzielle Synthese von ACh untersucht. Der Fokus in dieser Arbeit lag auf der Untersuchung einer ChAT-mRNA-Expression. Zusätzlich zur ChAT gibt es die Carnitinacetyltransferase (CarAT), ein Enzym, welches ebenfalls in der Lage ist, ACh, z.B. in Skelettmuskelzellen zu produzieren (Tuček 1982). Da ChAT nicht das einzige Enzym einer ACh-Synthese darstellt, ist folglich eine definitive Aussage über eine ACh-Synthese bei fehlender ChAT-mRNA Expression nicht zu treffen. Ergänzend sind weitere Untersuchungen, wie HPLC-Messungen oder funktionelle Messungen mittels Calciumimaging für eine definitive Aussage sinnvoll bzw. erforderlich.

Eine ACh-Synthese ohne ChAT-mRNA-Nachweis wurde von Lips et al. im Urothel angenommen, in dem geringe Mengen von ACh nachgewiesen wurden. Durch RT-PCR-Experimente konnte dort CarAT nachgewiesen werden, aber keine ChAT. VACHT, ein Transporter, der Vesikel mit ACh belädt, wurde nur in subepithelialen Nervenfasern nachgewiesen, nicht jedoch im Urothel (Lips et al. 2007b).

Ein Nachweis von ChAT-mRNA macht eine ACh-Synthese sehr wahrscheinlich. In der vorliegenden Arbeit konnte ChAT-mRNA mittels RT-PCR in Fibroblasten, parasympathischen Neuronen, Trachealabschnitten ohne Trachealepithel und isoliertem Trachealepithel nachgewiesen werden. Der Nachweis von ChAT-mRNA in sensorischen Neuronen von DRG und JNC gelang nicht eindeutig. Bei fehlendem Expressionsnachweis in der RT-PCR kann an die zusätzlich zur ChAT vom *common type* vorkommende Spleißvariante, die pChAT, gedacht werden und weitere Versuche mit unterschiedlichen Primern sollten erfolgen. In Experimenten von Bellier und Kimura zeigte sich mittels Immunhistochemie gegen pChAT in DRGs eine deutliche Anfärbung kleinerer und mittelgroßer Neurone. Zusätzlich färbten sich dünne Nervenfasern an. Im Gegensatz dazu wurden keinerlei Strukturen der DRGs mit cChAT-Antiserum angefärbt (Bellier und Kimura 2007). In einer Arbeit von Tata et al. (1994) wurde ChAT-Expression in DRGs früher Entwicklungsstufen von Hühner-Embryonen nachgewiesen. Auch bei weiteren Zellpopulationen wurde die Expression von ChAT-mRNA nachgewiesen. Bei glatten Muskelzellen der Atemwege wurde eine Expression von ChAT und eine ACh-Synthese gezeigt (Wessler und Kirkpatrick 2001), wobei deutlich hervorzuheben ist, dass eine positive Anti-ChAT-Immunhistochemie nicht gleichzusetzen ist mit einer ACh-Synthese. Ein ChAT-Nachweis erfolgte jedoch in der Mehrheit dieser Zellen (Wessler und Kirkpatrick 2008).

4.2.2 Cholin-Transporter, insbesondere CTLs

Die Aufnahme von Cholin in die Zelle findet über drei Gruppen von Transportern, die OCTs, CTLs und CHT1 statt. Da Zellen für die Synthese ihrer Zellmembran Cholin benötigen, ist die mRNA-Expression der genannten Transporter kein eindeutiges Indiz für die Synthese von ACh. Der Nachweis von mRNA für diese Transporter bestärkt bei zusätzlicher Präsenz von ChAT-mRNA die Vermutung, dass eine ACh-Synthese vorliegt. Die Anwesenheit von CTL-mRNA und CHT1-mRNA in Zellpopulationen der Atemwege wurde in dieser Arbeit untersucht. Das Vorhandensein von OCT-mRNA sowie VACHT-mRNA wurde in dieser Arbeit nicht untersucht.

CTL 1-5-mRNA wurde mittels RT-PCR in Trachealepithel und Trachealabschnitten ohne Epithel mit und ohne Knorpel nachgewiesen (Nassenstein et al. 2015). Ergänzend zu dem Nachweis von CTL-mRNA wurde mRNA von CHT1 und ChAT in Trachealepithel und epithelfreien Trachealabschnitten nachgewiesen.

Chávez et al. zeigten, dass die Inkubation von Trachealringen aus Meerschweinchen mit Paraoxon (AChE-Inhibitor) zu einer langsamen Kontraktionszunahme führt. Die Kontraktion war mit Atropin vollständig inhibierbar. Der CTL-Inhibitor Hemicholinium-3 bewirkte eine konzentrationsabhängige Veränderung der durch Paraoxon bedingten Kontraktion (Chávez et al. 2011). Nassenstein et al. konnten einen ähnlichen Effekt in Trachealabschnitten von Mäusen zeigen und einen entsprechenden Zusammenhang der nqACh-Freisetzung mit CTLs (Nassenstein et al. 2015). In der zuletzt genannten Arbeit zeigte sich bei Blockade der AChE/BChE eine langsam eintretende Kontraktionszunahme. Auch hier war die Kontraktionszunahme vollständig durch Atropin inhibierbar. Eine CTL-mRNA-Expression konnte nicht nur in isoliertem Trachealepithel, sondern auch in epithelbefreiten Trachealabschnitten nachgewiesen werden.

Aufgrund dieser Beobachtungen wurden weitere Zellpopulationen der Trachea, die als mögliche Quelle einer nqACh-Freisetzung in Frage kommen, auf das Vorhandensein von mRNA der oben genannten Transporter untersucht. Sensorische, atemwegsinnervierende Neurone aus DRG und JNC wiesen entsprechend mRNA für CTLs auf. In gepickten Neuronen aus DRG konnten bei 5 von 9 Neuronen CTL1- und bei 4 von 9 Neuronen CTL2-mRNA und in gepickten Neuronen des JNC konnten mehrheitlich CTL1- bzw. und/oder eine Variante von CTL1-mRNA (8 von 8 Neuronen) sowie CTL2- (6 von 8 Neuronen) und bei 2 von 8 Neuronen CTL5-mRNA nachgewiesen werden. Bei parasymphatischen Neuronen konnte bei einem Drittel der untersuchten Zellen CTL1- und bei 2 von 9 Neuronen CTL2-mRNA und bei der MC3T3-Zelllinie, stellvertretend für Fibroblasten in den Atemwegen, das Vorhandensein von mRNA für CTL1-3 gezeigt werden. Auch freie Zellen, wie u.a. die Alveolarmakrophagen könnten als zelluläre Quelle einer nqACh-Freisetzung eine Rolle spielen. In den untersuchten BAL-Zellen wurde mRNA für CTL 1 und 2 in allen Proben, CTL 3 und 4 in 4 von 5 und CTL 5 in einer von 5 Proben nachgewiesen.

Traiffort et al. beschreiben eine ähnliche Heterogenität des Vorkommens von CTL-mRNA in unterschiedlichen Geweben (Traiffort et al. 2005). Ihre Versuche mittels Northern Blot beschreiben ein starkes Vorkommen von CTL1 im Hirn. Das Vorkommen von CTL2-4 in diesem Gewebe wird als schwach bzw. nicht nachweisbar beschrieben. CTL3 wurde in Kolon, Ileum und Niere und CTL4 in hohem Maße in Intestinum, Niere und Magen sowie in geringerer Konzentration in Hoden und Lunge nachgewiesen. Die von Traiffort et al. dargestellten Ergebnisse unterstützen die in dieser Arbeit gezeigten RT-PCR-Ergebnisse und die Verteilung der CTL-mRNA in den untersuchten Geweben. So zeigten sie u.a. einen fehlenden Nachweis von CTL 3- und 4-mRNA in Nervengewebe, während sie diese mRNAs v.a. im Gastrointestinaltrakt und Niere beschrieben. Weitere Studien werden notwendig sein, um den Einfluss der unterschiedlichen CTLs sowie deren physiologischen und pathologischen Einfluss weiter zu verstehen.

4.3 Wie wird ACh aus der Zelle freigesetzt? Findet eine qACh-Freisetzung oder eine nqACh-Freisetzung statt?

Zur Bearbeitung dieser Fragestellung wurden tracheale Abschnitte mit Botulinumtoxin A inkubiert und anschließend im Organbad untersucht. Ziel war die Inhibition der quantalen ACh-Freisetzung durch Inhibition der SNARE-Komplexe. Die dargestellten Ergebnissen (vgl. Kap. 3.1) lassen keinen Rückschluss auf den Vorgang der ACh-Freisetzung zu, da bei erfolgreicher Inhibition einer vesikulären Freisetzung durch Botulinumtoxin eine reduzierte Reaktion auf EFS zu erwarten gewesen wäre. Da die Trachealreaktionsfähigkeit im Organbad mit der Zeit der Inkubation (nach 24-48 h) abnahm, wurde auf längere Inkubationszeiten verzichtet. Die Wirkung von Botulinumtoxin tritt nach ca. 24-72 h auf. In seltenen Fällen kann es bis zu fünf Tage dauern, bis die volle Wirkung beobachtet wird (Nigam und Nigam 2010). Die Wirkung von Botulinumtoxin erreicht nach etwa zehn Tagen das Wirkmaximum. Es ist daher anzunehmen, dass die Inkubationszeit der In vitro-Versuche für eine maximale Wirkung nicht ausreichend war und die vorliegenden Ergebnisse daher keinen Rückschluss zu lassen. Ob sich die bei Nassenstein et al. (2015) beobachtete tracheale Kontraktionszunahme nach Eseringabe im Organbad durch eine nqACh-Freisetzung zustande kam, oder Effekt einer quantalen (vesikulären) Freisetzung war, lässt sich mit diesem Experiment nicht klären.

4.4 Ist eine (nq)ACh-Freisetzung aus verschiedenen Geweben in den Atemwegen funktionell nachweisbar und kann dieses reguliert werden?

Die weitere Ausgangsfrage, die in dieser Arbeit zu untersuchen war, beschäftigt sich mit einer (nq)ACh-Freisetzung verschiedener Gewebe in den Atemwegen und deren funktionellen Nachweisbarkeit.

4.4.1 Co-Kultivierung von Neuronen und Reporterzellen

Durch Co-Kultivierung von isolierten Neuronen mit mAChR3-Reporterzellen sollte direkt freigesetztes ACh im Ca^{2+} -Imaging visualisiert werden. Die Biosensor-Technik mittels *Chinese hamster ovary* (CHO) K1 Zellen/mAChR3-Reporterzellen, beladen mit dem Ca^{2+} -Indikator Fura-2, bietet ein sensitives System zum Nachweis von ACh. Sowohl für die Detektion von freigesetztem ACh einzelner Zellen als auch ganzer Gewebe kann dieses System verwendet werden und einen Aufschluss über das sekretorische Profil der entsprechenden Zellen geben (Rodriguez-Diaz et al. 2012). Da Neurone und Reporterzellen in unterschiedlichen Medien kultiviert werden, wurde in Vorversuchen die Reaktionsfähigkeit der Reporterzellen in L15⁺-Medium, welches für Versuche mit Neuronen verwendet wird, getestet (vgl. Kap. 3.2.1).

Zuvor wurde untersucht, ob es sich bei einer beobachteten Zellreaktion bei Neuronen (gepickte JNC-Neurone) um eine über muskarinische Rezeptoren vermittelte Reaktion handeln könnte. Bei 40 % der untersuchten Neurone waren mAChR nachweisbar. Da nur die Minderheit dieser Neurone mAChR1, 3 oder 5 aufwies, die Ca^{2+} -abhängige Signalwege über den Phospholipase C-Signalweg aktivieren, limitiert dies die Möglichkeit der Detektion freigesetzten ACh und deren Visualisierung im Ca^{2+} -Imaging über Neurone. Die Zellen (Neurone und später hinzugegebene Reporterzellen) auf den Deckgläschen wurden anschließend stimuliert und die ACh-Freisetzung mit Hilfe des Ca^{2+} -Imagings gemessen. Die Reaktionsantwort der Reporterzellen war hierbei relevant. Diese zeigte in der Co-Kultivierung mit DRG einen nahezu signifikanten ($p=0,0523$; Mann-Whitney-Test) Unterschied, der auf eine ACh-Freisetzung hindeuten könnte. Die Positivkontrollen waren möglicherweise aufgrund der Kultivierungsbedingungen teils reduziert und somit eine Aussage über eine (nq)ACh-Freisetzung nur bedingt zu treffen. Möglich wäre, dass die fehlende Reaktion auf die Kontrollen an der vierminütigen Belichtung zuvor liegen könnte, die auch zu einer Abnahme der Reaktionsstärke führen kann. Eigene Versuche (Abb. 3-6 B) mit Neuronen und repetitiver Stimulation zeigten, dass diese über bis zu 12 Minuten im Ca^{2+} -Imaging beobachtet und stimuliert werden

können. Betrachtet man die Versuche von O'Mullane et al., so sollte eine Belichtung im Ca^{2+} -Imaging über mindestens zehn Minuten zu keine Beeinträchtigung der Messungen führen (O'Mullane et al. 2013), sodass eine Reaktion auf die Positivkontrollen zu erwarten gewesen wäre. Zudem ist anzunehmen, dass die Kulturbedingungen sowie die Adhärenz der Zellen auf den Deckgläschen zu optimieren war. Das zweizeitige Aufbringen der Zellen auf den Deckgläschen erwies sich somit als unpraktikabel, sodass die Reporterzellen zusammen mit den Neuronen zeitgleich über Nacht inkubiert und entsprechend am nächsten Tag gemessen wurden. Die Adhärenz der Zellen war deutlich besser, sodass mehr Zellen gemessen werden konnten.

Eine signifikante Reaktion der DRG (TRPV1⁻-Neurone) zeigte sich im Ca^{2+} -Imaging. Verglichen wurden dabei die Reaktion nach Eserinapplikation mit entsprechender Kontrolle. Die Messung von Neuronen aus JNC (TRPV1⁺-Neurone) mit Reporterzellen zeigte eine signifikante Zellreaktion nach Eserinapplikation. Trotz dieser Reaktion wurde entschieden, mit weiteren Versuchen der Monokulturen fortzufahren und somit die Zellpopulationen einzeln zu untersuchen. Darüber hinaus sollte im Rahmen von Co-Kultivierungen andere Medien sowie Veränderungen der Kultivierungsbedingungen in weiteren Projekten untersucht werden. Grundsätzlich stellt die Co-Kultivierung eine gute Möglichkeit dar, um die sekretorische Eigenschaft von einzelnen Zellen zu beurteilen. Sie ist aber von dem experimentellen Aufbau sowie den Reporterzellen stark abhängig.

4.4.2 ACh-Bestimmung mittels Reporterzellen in Überständen isolierter Zellpopulationen

Die Stimulation von Reporterzellen mit Überständen von DRGs zeigte keinen signifikanten Nachweis eines $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiegs. Nach Applikation des Überstandes kam es hingegen zu einem signifikanten Abfall der Fura-2-Ratio, der am ehesten auf die Applikation des Überstandes zurückzuführen ist und als artifiziell anzusehen ist. Im Gegensatz dazu zeigte sich in Überständen von JNC-Neuronen eine signifikante Reaktion der mAChR3-Reporterzellen. Diese kann für eine ACh-Freisetzung der Neurone nach Eserinapplikation sprechen. Zur genaueren Untersuchung wären Experimente mit zusätzlicher Applikation von Atropin sinnvoll. Da sich die Frage stellte, ob die Ca^{2+} -Imaging-Experimente für den Nachweis freigesetzten ACh aus isolierten und dissoziierten Zellpopulationen ausreichend sensitiv sind, wurden weitere Messungen mittels HPLC zur Bestimmung der ACh-Konzentration durchgeführt.

Im Ca^{2+} -Imaging einer Fibroblastenzelllinie, MC3T3, zeigte sich keine signifikante Reaktion auf Überstand und somit kein Hinweis auf eine ACh-Freisetzung.

Überstand von parasympathischen Neuronen zeigte im Ca^{2+} -Imaging keine Reaktion auf die Applikation des Überstandes auf Reporterzellen. Es hätte erwartet werden können, dass der Überstand parasympathischer und somit cholinerges Neurone zu einer Stimulation von Reporterzellen durch freigesetztes ACh führt. Schaut man sich jedoch zugleich die Ergebnisse der RT-PCR an, so zeigen diese das Vorkommen von ChAT-mRNA gerade einmal bei 2 von 9 isolierten Neuronen. Dies könnte daran liegen, dass sich die vorhandene Menge an mRNA unterhalb der Nachweisgrenze befand. Darüber hinaus beschreibt die RT-PCR eine Momentaufnahme der vorliegenden mRNA. Somit der fehlende Nachweis in der RT-PCR kein absoluter Ausschluss des Vorliegens von ChAT-mRNA in der isolierten Zelle.

Überstände von isolierten Tracheen führten im Ca^{2+} -Imaging zu einem signifikanten Anstieg. Der Anstieg in % Baseline nach Stimulation mit Überstand mit f-MKKFRW war ebenfalls signifikant und die Zellreaktion der Reporterzellen im Ca^{2+} -Imaging war nach Stimulation mit Überstand mit f-MKKFRW signifikant höher als der Anstieg nach Stimulation mit Überstand ohne f-MKKFRW.

4.4.3 ACh-Bestimmung mittels HPLC-Messungen

Die anschließend durchgeführten HPLC-Messungen zeigten eine Nachweisbarkeit von ACh in den Zellpellets der Neurone, aber keinen Nachweis in den Zellüberständen. Dies steht im Widerspruch zu den Ca^{2+} -Imaging-Versuchen mit Zellüberständen von isolierten Neuronen aus JNC, bei denen eine signifikante Reaktion von mAChR3-Zellen gezeigt wurde. Da ein Nachweis von ACh in den Zellpellets in der HPLC gezeigt wurde, ist eine Reaktion im Ca^{2+} -Imaging nicht ausgeschlossen. Corsetti et al. (2012) wiesen bei DRGs eine ACh-Basalrate sowie nach KCl-Stimulation im Bereich von ca. 5-30 pmol/Ganglion nach (Corsetti et al. 2012). Mit dem Hintergrund der Ca^{2+} -Imaging-Experimenten mit Überständen wäre ein Nachweis von ACh im Überstand zu erwarten gewesen. Eine mögliche Ursache kann auf die Probenerstellung zurückzuführen sein. Zusammenfassend sprechen vorangegangene Forschungen und die Ergebnisse dieser Arbeit für eine Möglichkeit der ACh-Freisetzung durch sensorische Neurone aus DRG und JNC.

4.4.4 Organbadexperimente mit mastzelldefizienten Mäusen

Um zu untersuchen, ob Mastzellen als Quelle einer (nq)ACh-Freisetzung in Frage kommen könnten, wurden analog zu den Versuchen von Nassenstein et al. (2015) Organbadversuche zur Messung der Trachealkontraktion mit KitWSh- (mastzelldefizienten Mäusen) und Kontrolltieren (B6-Cg-Tg(Wnt1-Cre)11Rth Tg(Wnt1-GAL4)11Rth/J) durchgeführt. Nach erfolgter EFS erfolgte eine Zugabe von 10 μ M Eserin, anschließend eine erneute EFS und eine Stimulation mit 10^{-6} M Muskarin. Nach 11 min war die Kraftzunahme der Trachealsegmente bei den KitWSh-Tieren signifikant höher als die der Kontrolltiere. Mit der Annahme, dass Mastzellen ACh freisetzen, wäre eine reduzierte Kontraktion der Trachealsegmente zu erwarten gewesen. Statt dieser Reduzierten erfolgte eine stärkere Kontraktionszunahme. Dieser Versuch zeigt keinen Hinweis für eine ACh-Freisetzung durch Mastzellen. Betrachtet man die Effekte (Bronchokonstriktion, Mukussekretion oder Schleimhautödem) der Mediatoren der Mastzellen, die z.B. bei Asthma eine Rolle spielen, ist der gezeigte Effekt der vermehrten Kontraktionszunahme der Trachealabschnitte der mastzelldefizienten Mäuse im Organbad nicht zu erklären (Cruse und Bradding 2016). Ein wichtiger Mediator der Mastzellen ist Histamin. Die Freisetzung von Histamin durch Mastzellen wird durch ACh, z.B. endogen freigesetztes aus Epithel, gehemmt. Über muskarinische Rezeptoren besteht somit eine Kommunikationsmöglichkeit und einer Regulation der Mastzellaktivierung und Freisetzung der Mediatoren zum Erhalt eines Gleichgewichtes in den Atemwegen (Reinheimer et al. 1997). Vor diesem Hintergrund stellt sich die Frage, inwieweit die ACh-Freisetzung durch Mastzellen physiologisch sinnvoll wäre, wenn diese ihre eigene Funktion limitieren würde.

4.5 Kann eine non-neuronale ACh-Freisetzung in den Atemwegen funktionell reguliert werden?

4.5.1 Steigerung der ACh-Freisetzung durch f-MKKFRW

Parallel zu dieser Arbeit zeigten Perniss et al. (2020), dass ein bakterielles Signalpeptid mit der Aminosäurekernsequenz f-MKKFRW in der explantierten Trachea der Maus die Partikeltransportgeschwindigkeit auf der Schleimhautoberfläche und damit die mukoziliäre Clearance steigert. Die mukoziliäre Clearance ist ein prominenter angeborener Abwehrmechanismus der Atemwege, womit dies eine sinnvolle Reaktion auf das Vorhandensein möglicher pathogener Keime darstellt. In der Tat ist das MKKFRW-Motiv für viele lungenpathogene Keime charakteristisch. Es ist überwiegend

in Membranproteinen von Enterobacteriaceae (u. a. E. coli und Salmonella) vorhanden. Des Weiteren ist MKKFRW hauptsächlich in der N-terminalen Sequenz des virulenzassoziierten Proteins MgrB beinhaltet. Generell ist von formylierten bakteriellen Peptiden bekannt, dass sie von verschiedenen Zellen des Immunsystems über Formylpeptid-Rezeptoren (FPR) erkannt werden (Bufe et al. 2019). FPR sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und funktionieren als Chemorezeptoren des angeborenen Immunsystems. Bakterielle Signalpeptide stellen die derzeit größte heterogene Gruppe aus G-Protein-gekoppelten Rezeptoragonisten dar. In diesem speziellen Fall konnte jedoch eine Wirkung über FPR ausgeschlossen werden und der Rezeptor für f-MKKFRW ist noch nicht bekannt. Die Versuche von Perniss et al. (2020) wiesen darauf hin, dass f-MKKFRW nicht direkt auf die zilienträgenden Zellen des Epithels wirkt, sondern zunächst auf eine andere, seltene Zelle des Epithels, die sogenannte chemosensorische Zelle oder auch Bürstenzelle. Für diese Zelle gab es einen Hinweis auf die Expression des ACh-Synthesenzym ChAT und durch pharmakologische Inhibition muskarinischer Rezeptoren konnte die Wirkung von f-MKKFRW auf den Partikeltransport unterbunden werden. Dies legte nahe, dass f-MKKFRW ein Stimulus für die ACh-Freisetzung aus dem Epithel, speziell aus den chemosensorischen Zellen darstellt. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit in gemeinsamen Versuchen mit Alexander Perniss überprüft. Durch eine Stimulation von Trachealabschnitten mit f-MKKFRW gelang es, die Reporterzellantwort in Ca^{2+} -Imaging-Experimenten zu steigern und die ACh-Konzentration in den Überständen, gemessen mittels HPLC, signifikant zu erhöhen. Die gezeigten Ergebnisse zeigen ACh als einen akuten Effektor in der Frühphase der angeborenen Immunantwort auf bakterielle Peptide, wie f-MKKFR (Perniss et al. 2020). Die beschriebenen und beobachteten Ergebnisse zeigen das Trachealepithel als Quelle einer nqACh-Freisetzung. f-MKKFRW stimuliert die mukoziliäre Clearance in den Atemwegen von Mäusen und stellt einen zusätzlichen Weg der bakteriellen Abwehr in den Atemwegen dar. Die durch f-MKKFRW stimulierte Erhöhung der ziliären Schlagfrequenz ist FPR-unabhängig. f-MKKFRW aktiviert einen TRPM5-abhängigen Signalweg. Durch weitere Experimente mit optogenetischer Stimulation von chemosensorischen Epithelzellen konnte gezeigt werden, dass diese cholinerg und ACh-produzierend sind (Kummer et al. 2016; Perniss et al. 2020). Durch bakterielle Peptide, wie f-MKKFRW, zeigt sich eine Regulierbarkeit der nqACh-Freisetzung.

4.6 Mögliche klinische Relevanz

Asthma bronchiale und die *chronic obstructive pulmonary disease* (COPD) sind häufige Atemwegserkrankungen. Asthma bronchiale ist die mit Abstand häufigste chronisch-entzündliche Erkrankung des Menschen überhaupt, bei der es anfallsartig zu reversibler Obstruktion der unteren Atemwege kommt. Gekennzeichnet ist das Asthma bronchiale durch ein Bronchialwandödem, Hyper- und Dyskrie und Bronchospasmus sowie eine bronchiale Hyperreagibilität. Rauchen ist der größte Risikofaktor für pulmonale Erkrankungen, wie z.B. die chronische Bronchitis oder die COPD. Durch rezidivierende Infekte mit entsprechender Entzündungsreaktion sind Atemwegsobstruktionen mögliche Folgen und führen zu einer Zerstörung des Flimmerepithels und einer Atrophie der Bronchialschleimhaut und weiter zu einer irreversiblen Erweiterung der Bronchiolen und Alveolen, einem Lungenemphysem (Balkissoon et al. 2011; Ukena et al. 2008). Daher stellt sich die Frage, inwieweit das non-neuronale ACh eine Rolle bei der Atemwegsobstruktion spielt und diese beeinflusst. Nachdem in dieser Arbeit das Atemwegsepithel als Hauptquelle einer non-neuronalen ACh-Freisetzung gezeigt werden konnte, stellt sich u.a. die Frage, wie sich Zigarettenrauch und die damit verbundenen Folgen, einschließlich der Erkrankungen, auf den Kreislauf der nqACh-Freisetzung verhalten. Die Wiederholung von Organbad-Experimenten mit Trachealabschnitten von Mäusen nach Rauchexposition bzw. mit genannten Atemwegserkrankungen wäre eine Möglichkeit, dies zu untersuchen. In einer Studie wurden Proteine des cholinergen Signalwegs in Neutrophilen Granulozyten untersucht. Die Expression der muskarinischen Rezeptoren, v.a. M2- und M4-Subtypen, in neutrophilen Granulozyten im Blut sowie im Sputum war bei Patienten mit einer stabilen COPD oder einer exazerbierten COPD im Vergleich zu Gesunden signifikant erhöht ($p < 0.05$). Die Expression der ChAT war bei der Gruppe der Erkrankten ebenfalls signifikant erhöht ($p < 0.05$) (Milara et al. 2016). Mit der Annahme, dass auch im Atemwegsepithel, als Hauptquelle der non-neuronalen ACh-Synthese in den Atemwegen, analog zu den Ergebnissen von Milara et al., eine verstärkte Expression von u.a. ChAT bei Mäusen nach Rauchexposition bzw. mit einer COPD vorhanden sei, wäre in den Versuchen eine verstärkte Kontraktion nach Eseringabe, aufgrund der möglichen signifikant erhöhten ChAT-Expression, im Vergleich zur Kontrollgruppe mit gesunden Tieren zu erwarten. Insbesondere chemosensorische Zellen des Atemwegsepithels haben einen Effekt bei der Infektabwehr durch eine Stimulation der mukoziliären Clearance. Eine erhöhte

Infektanfälligkeit zeigte sich bei *Trpm5*-defizienten-Mäusen (Perniss et al. 2020). Aber nicht nur die chronische Erkrankung führt zu einer Veränderung der ACh-Synthese und -Freisetzung. Auch das akute allergische Asthma beeinflusst das non-neuronale System stark. Lips et al. konnten eine signifikant herabgesetzte ChAT-Expression bei Rattenlungen 24 h nach Ovalbumin (OVA)-Stimulation im Vergleich zu Kontrolltieren zeigen. Nach 48 h wurde eine signifikante Herunterregulation von CHT1, VAcHT und OCT3 gezeigt. OCT2 war nach 24 h und 48 h bereits stark reduziert. In Zellen der BAL konnte eine signifikante Herunterregulation von ChAT-, OCT1-, VAcHT- und CHT1-mRNA-Expression nach 24 h und 48 h beobachtet werden (Lips et al. 2007a). Im Vergleich zu der Arbeit von Milara et al. zeigt sich hier eine Reduktion der ChAT-, OCT1-, VAcHT- und CHT1-mRNA-Expression bei akutem allergischem Asthma. Dies hätte im Vergleich zu den Ergebnissen von Milara et al. einen positiven Effekt, unter der Annahme, dass es bei einer vermehrten Expression zu einer verstärkten Kontraktion der Atemwege kommt. Durch den Einfluss von ACh in viele regulatorische Wege trägt die Herunterregulierung des non-neuronalen Systems wahrscheinlich zu einem Teil des Pathomechanismus des Asthma bronchiale bei (Lips et al. 2007a; Wessler et al. 1999). Durch die Entdeckung von ACh in verschiedenen non-neuronalen Zellpopulationen entsteht eine neue pharmakologische Therapiemöglichkeit. Lips et al. beschreiben in ihrer Arbeit unterschiedliche Systeme der ACh-Freisetzung: neuronal versus non-neuronal. Im Urothel ist ACh in gleicher Konzentration nachzuweisen wie in anderen Oberflächenepithelien. Es lässt sich im Urothel keine ChAT-mRNA nachweisen. Darüber hinaus zeigt sich ein Fehlen des VAcHT, dem Protein zum Verpacken von ACh aus dem Zytoplasma in Vesikel in Nervenendigungen, im Urothel. Es wurde gezeigt, dass OCT1 eine Hauptfreisetzungsmöglichkeit für ACh in der Blasenschleimhaut darstellt. Dadurch, dass sich die ACh-Freisetzungsmechanismen von anderen non-neuronalen Systemen unterscheiden, ergibt dies neue pharmakologische Ansätze, wie z.B. mit Trospium zur Behandlung der überaktiven Harnblase (Lips et al. 2007b).

Zusammenfassend lässt sich das non-neuronale cholinerge System als Komplex zur ACh-Freisetzung, fernab der neuromuskulären Endplatte oder des vegetativen Nervensystems, verstehen. Viele Zellen enthalten Transporter, Kanäle oder Enzyme einer ACh-Synthese. Die Freisetzung ist in diesem System nicht durch Vesikel vermittelt. Es ist anzunehmen, dass der beobachtete Effekt häufig erst in Zusammenspiel mehrerer ACh-produzierender Zellgruppen experimentell demonstrierbar ist. Die beobachtete ACh-Freisetzung ist

stimulierbar, wie z.B. mit f-MKKFRW aus chemosensorischen Epithelzellen. Die klinische Relevanz kann bedeutend sein, so z.B. bei der Abwehr bakterieller Infektionen. Die Funktion dieser Form der ACh-Freisetzung ist vielfältig und die klinische Relevanz sowie deren pharmakologische Beeinflussbarkeit Inhalt weiterer Forschung.

5. Zusammenfassung

Acetylcholin (ACh) ist der Haupttransmitter für die Kontraktion der glatten Atemwegsmuskulatur. Zusätzlich zur vesikelvermittelten ACh-Freisetzung wurde eine nicht-vesikulär vermittelte, non-quantale (nq) ACh-Freisetzung in isolierten Trachealabschnitten beobachtet, welche in der Lage ist, welche nach Hemmung des ACh-Abbaus durch Eserin ohne Nervenreizung kontrahierten (Nassenstein et al. 2015). Ziel dieser Arbeit war es, mögliche zelluläre Quellen einer (nq)ACh-Freisetzung in Atemwegen von Mäusen zu untersuchen. Verwendet wurden hierfür die RT-PCR mit Nachweis von CTL-, CHT1- und ChAT-mRNA in u.a. isolierten Neuronen und Trachealepithel, das Organbad mit Nachweis einer trachealen Kontraktionszunahme nach Eseringabe, die ACh-Messung in trachealen Überständen aus Organbadversuchen und in Überständen stimulierter Trachealabschnitte über eine Biosensor-Technik mittels Ca^{2+} -Imaging von Zellen mit einer Überexpression muskarinischer ACh-Rezeptoren sowie die HPLC mit Nachweis einer ACh-Freisetzung aus Trachealepithel und die immunhistochemische Färbung von Ganglien aus JNC und DRG und die immunhistochemische Färbung der Trachea. Mit den genannten Methoden wurden unterschiedliche Zellpopulationen auf das Vorhandensein von Transportern sowie Enzymen einer ACh-Synthese untersucht. So konnten ChAT- und CHT1-mRNA in epithelfreien Trachealabschnitten sowie untersuchten Proben von isoliertem Atemwegsepithel, CTL-mRNA in der Mehrheit der untersuchten sensorischen Neuronen, CTL- und teils ChAT-mRNA in Alveolarmakrophagen aus der BAL und CTL- und ChAT-mRNA in Fibroblasten gezeigt werden. Ergänzend konnte durch Ca^{2+} -Imaging-Experimente eine ACh-Freisetzung, z.B. durch das Trachealepithel oder sensorische Neurone, gezeigt werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass das Trachealepithel Quelle einer ACh-Freisetzung in den Atemwegen der Mäuse darstellt, die durch das bakterielle Peptid f-MKKFRW stimulierbar ist. Zusammenfassend sprechen die gezeigten Ergebnisse dafür, dass ACh von unterschiedlichen Zellpopulationen in den Atemwegen von Mäusen gebildet wird, wie insbesondere den chemosensorischen Zellen des Atemwegsepithel, sensorischen Neuronen aus JNC und DRG, Alveolarmakrophagen und Fibroblasten. Eine wichtige Quelle stellt dabei das respiratorische Epithel mit den chemosensorischen Zellen dar. Der bei Nassenstein et al. 2015 beobachtete Effekt könnte eine Summe von ACh aus unterschiedlichen Zellpopulationen sein, wobei das Atemwegsepithel als mögliche Hauptquelle in Frage kommt und die Freisetzung durch bakterielle Peptide stimulierbar ist.

6. Summary

Acetylcholine (ACh) is the main transmitter causing airway smooth muscle contraction. In addition to vesicular ACh release, a non-vesicular, non-quantal (nq) ACh release was observed in isolated tracheal segments, which contracted after blockade of ACh degradation by eserine treatment without further nerve stimulation (Nassenstein et al. 2015). Aim of this work was to investigate possible cellular sources of this (nq)ACh release in airways of mice. The methods used were RT-PCR to detection of CTL-, CHT1- and ChAT-mRNA in, e.g. isolated neurons and tracheal epithelium, recording of constriction of tracheal segments treated with eserine in organ bath experiments, measuring ACh in tracheal supernatants from organ bath experiments and in supernatants of stimulated tracheal sections with a biosensor technique using Ca^{2+} -imaging of cells overexpressing muscarinic ACh receptors, as well as HPLC with evidence of ACh release from tracheal epithelium and immunohistochemical staining of ganglia from JNC and DRG and from trachea. With these techniques, the existence of transporters and enzymes involved in ACh-synthesis was shown in different cell populations. ChAT- and CHT1-mRNA were detected in epithelial-free tracheal segments and samples of isolated airway epithelium, CTL-mRNA in most of the examined sensory neurons, CTL- and, partly, ChAT-mRNA in alveolar macrophages from BAL, and CTL- and ChAT-mRNA in fibroblasts. In addition, release of ACh by tracheal epithelium and sensory neurons was shown by Ca^{2+} -imaging experiments. The tracheal epithelium was identified as a source of ACh release in response to exposure to the bacterial peptide f-MKKFRW.

Collectively, the present results suggest that ACh is produced by different cell populations in mouse airways, in particular the chemosensory cells of airway epithelium, sensory neurons from JNC and DRG, alveolar macrophages and fibroblasts. An important source is the respiratory epithelium with its chemosensory cells. The effect observed by Nassenstein et al. 2015 could be a sum of ACh from different cell populations, with the airway epithelium being a possible main source. The release can be triggered by bacterial peptides.

7. Abkürzungsverzeichnis

ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterase
ASM	<i>Airway smooth muscle</i>
BChE	Butyrylcholinesterase
cCHAT	Cholin-Acetyltransferase, <i>common type</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
ChAT	Cholin-Acetyltransferase
CGRP	Calcitonin gene-related peptide
CHT1	<i>High-affinity choline transporter 1</i>
CTL	<i>Choline Transporter-like protein</i>
CPS	Capsaicin
dNTPs	<i>Desoxy Nukleidtripeptide</i>
DRGs	Dorsal root ganglia (Spinalganglien)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	Fetales Kälberserum
Ggl	Ganglion
H ₂ O	Wasser
HBSS	Hank`s Balances Salt Solution
JNC	<i>Jugular nodose complex</i>
L-15 ⁺ Medium	L-15 Medium mit 10 % FCS und 1 % P/S
mAChR	muskarinischer ACh Rezeptor
mAChR3	muskarinischer ACh Rezeptor 3
nAChR	nikotinischer ACh Rezeptor
NPY	Neuropeptid Y
nqACh	non-quantales ACh
OCTs	<i>Organic Cation Transporters</i>
P/S	Penicillin/Streptomycin
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
pChAT	Cholin-Acetyltransferase, peripherer Typ
PNS	Peripheres Nervensystem
Rpm	<i>Rounds per minute</i>

PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (dt. Polymerase-Ketten-Reaktion)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SS II	SuperScript II
SS III	SuperScript III
SP	Substance P
TH	Tyrosinhydroxylase
TRPV1	<i>Transient Receptor Potential Vanilloid 1</i>
VAcHT	<i>Vesicular acetylcholine transporter</i>
VNO	Vomeronasalorgan
ZNS	Zentrales Nervensystem

8. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1: Strukturformeln von ACh und Eserin.	1
Abb. 1-2: Wege der ACh-Synthese, Freisetzung und Abbaues.	7
Abb. 1-3: Cholin-Acetyltransferase (ChAT) Varianten.....	9
Abb. 1-4: Schematische Darstellung der Wirkung von Botulinumtoxin.	13
Abb. 1-5: Schematische Darstellung und Wandaufbau der Trachea.	15
Abb. 2-1: Präparation der Trachea.....	21
Abb. 2-2: Dissoziierte und isolierte Spinalganglienzellen.	25
Abb. 2-3: Messkammer für Ca ²⁺ -Imaging-Experimente.....	28
Abb. 2-4: Bestimmung der Zellgröße am Beispiel von mAChR3-Reporterzellen.....	28
Abb. 2-5: Bildausschnitt während einer Ca ²⁺ -Imaging Messung.....	30
Abb. 3-1: Tracheale Kraftzunahme in Organbadversuchen nach Inkubation mit Botulinumtoxin.....	46
Abb. 3-2: Konzentrationsabhängige Reaktion auf ACh von Reporterzellen mittels Ca ²⁺ -Imaging.....	47
Abb. 3-3: Einfluss unterschiedlicher Kulturmedien (F-12-Medium und L15 ⁺ -Medium) auf Ca ²⁺ -Imaging-Experimenten mit Reporterzellen.	48
Abb. 3-4: Reporterzellen sind signifikant kleiner als Neurone aus DRG und JNC	50
Abb. 3-5: Reaktionsfähigkeit von mAChR3-Reporterzellen in Abhängigkeit von der Beladezeit mit Fura-2 AM.....	51
Abb. 3-6: Repetitive Stimulation von mAChR3-Reporterzellen mit ACh (10 ⁻⁶ M bzw. 10 ⁻⁹ M).....	52
Abb. 3-7: Kumulative Dosis-Wirkungskurve trachealer Abschnitte im Organbad auf steigende ACh-Konzentrationen.	53
Abb. 3-8: Reaktion von mAChR3-Reporterzellen im Ca ²⁺ -Imaging auf Organbadüberstände.....	54
Abb. 3-9: Immunhistochemische Lokalisation ChAT-positiver Strukturen in Trachea und Lungenabschnitten.....	55
Abb. 3-10: Nachweis einer mRNA-Expression von ChAT und CHT1 in epithelfreien Trachealabschnitten.....	56
Abb. 3-11: Fotoaufnahmen von kultivierten Reporterzellen und Neuronen durch das Leica Dm5000B (20fache Objektivvergrößerung).....	57
Abb. 3-12: Co-Kultivierung von isolierten Neuronen und Reporterzellen.....	58
Abb. 3-13: Co-Kultivierung von Reporterzellen und Neuronen, sowie funktionelle Messung einer ACh-Freisetzung im Ca ²⁺ -Imaging.....	59
Abb. 3-14: Statistische Auswertung der funktionellen Ca ²⁺ -Imaging-Messungen von Co-Kultivierung isolierter Neurone aus JNC und DRG mit Reporterzellen.....	60
Abb. 3-15: Nachweis von mAChR-mRNA in isolierten JNC-Neuronen.	61
Abb. 3-16: Immunhistochemische Lokalisation ChAT-positiver Strukturen in DRGs.....	62
Abb. 3-17: mRNA-Nachweis cholinerg Komponenten in isolierten Spinalganglienneuronen.	63

Abb. 3-18: Reaktion im Ca ²⁺ -Imaging von mAChR3-Reporterzellen auf Überstände von Spinalganglien.	64
Abb. 3-19: Immunhistochemische Lokalisation ChAT-positiver Strukturen in einem Serienschnitt eines JNC.	65
Abb. 3-20: mRNA-Expression von CTL1-5, CHT1 und ChAT sowie β-Aktin in isolierten JNC-Neuronen.	66
Abb. 3-21: Signifikante Reaktion im Ca ²⁺ -Imaging von mAChR3-Reporterzellen auf Überstände von Neuronen aus JNCs.	67
Abb. 3-22: Mittels HPLC gemessene ACh-Konzentrationen in Überständen von DRG und JNC.....	68
Abb. 3-23: mRNA-Expression von CTL1-2, CHT1 und ChAT sowie β-Aktin in isolierten Neuronen des Ggl. pterygopalatinum.	69
Abb. 3-24: Keine Reaktion von mAChR3-Reporterzellen auf Überstände von parasympathischen Neuronen.....	70
Abb. 3-25: Murine Fibroblastenzelllinie MC3T3 exprimiert mRNA für CTL1-5 und ChAT.....	71
Abb. 3-26: Überstand der Fibroblastenzelllinie MC3T3 führt zu keiner nachweisbare Reaktion von mAChR3-Reporterzellen im Ca ²⁺ -Imaging.	72
Abb. 3-27: Bild eines Zytophot einer BAL mit gut erkennbaren Zellen.....	73
Abb. 3-28: mRNA-Expression von CTL1-5, CHT1, ChAT und β-Aktin.	74
Abb. 3-29: Histologische Färbung von Dünndarmschnitten von KitWSh Mäusen und Wildtypieren.....	75
Abb. 3-30: Tracheale Kraftzunahme Mastzell-defizienter Mäuse.	76
Abb. 3-31: mRNA-Expression von ChAT und CHT1 in mechanisch isoliertem Trachealepithel.	77
Abb. 3-32 A: Reaktion von mAChR3-Reporterzellen auf Überstand von isolierten Tracheen mit und ohne f-MKKFRW.....	79
Abb. 3-33: Atropin inhibiert die Reaktion von mAChR3-Reporterzellen im Ca ²⁺ -Imaging auf Überstand von isolierten Tracheen.....	80
Abb. 3-34: Steigerung der ACh-Freisetzung durch Stimulation mit f-MKKFRW.	81

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste der verwendeten Primer	35
Tabelle 2: Filter und Farbstoffe der Fluoreszenzmikroskopie	42

10. Literaturverzeichnis

Albuquerque, Edson X.; Pereira, Edna F. R.; Alkondon, Manickavasagam; Rogers, Scott W. (2009): Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. In: *Physiological reviews* 89 (1), S. 73–120. DOI: 10.1152/physrev.00015.2008.

ATCC (2018): M3WT4 (ATCC® CRL1981™). Produktbeschreibung.

Audrit, Katrin Julia; Delventhal, Lucas; Aydin, Öznur; Nassenstein, Christina (2017): The nervous system of airways and its remodeling in inflammatory lung diseases. In: *Cell and tissue research* 367 (3), S. 571–590. DOI: 10.1007/s00441-016-2559-7.

Aumüller, Gerhard; Wurzinger, Laurenz J. (2010): Anatomie. 208 Tabellen. 2. überarb. Aufl. Stuttgart: Thieme (Duale Reihe). Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1055/b-002-46981>. Zuletzt aufgerufen am 22.02.2022 15:47 Uhr.

Balkissoon, Ron; Lommatzsch, Steve; Carolan, Brendan; Make, Barry (2011): Chronic obstructive pulmonary disease: a concise review. In: *The Medical clinics of North America* 95 (6), S. 1125–1141. DOI: 10.1016/j.mcna.2011.08.009.

Barnes, P. J. (1992): Neural mechanisms in asthma. In: *British medical bulletin* 48 (1), S. 149–168.

Bellier, Jean-Pierre; Kimura, Hiroshi (2007): Acetylcholine synthesis by choline acetyltransferase of a peripheral type as demonstrated in adult rat dorsal root ganglion. In: *Journal of neurochemistry* 101 (6), S. 1607–1618. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2007.04458.x.

Bellier, J-P; Kimura, H. (2011): Peripheral type of choline acetyltransferase: biological and evolutionary implications for novel mechanisms in cholinergic system. In: *Journal of chemical neuroanatomy* 42 (4), S. 225–235. DOI: 10.1016/j.jchemneu.2011.02.005.

Bufe, Bernd; Schumann, Timo; Kappl, Reinhard; Bogeski, Ivan; Kummerow, Carsten; Podgórska, Marta et al. (2015): Recognition of Bacterial Signal Peptides by Mammalian Formyl Peptide Receptors: A NEW MECHANISM FOR SENSING PATHOGENS*. In: *The Journal of Biological Chemistry* 290 (12), S. 7369–7387. DOI: 10.1074/jbc.M114.626747.

Bufe, Bernd; Teuchert, Yannick; Schmid, Andreas; Pyrski, Martina; Pérez-Gómez, Anabel; Eisenbeis, Janina et al. (2019): Bacterial MgrB peptide activates chemoreceptor

Fpr3 in mouse accessory olfactory system and drives avoidance behaviour. In: *Nature communications* 10 (1), S. 4889. DOI: 10.1038/s41467-019-12842-x.

Caterina, M. J.; Schumacher, M. A.; Tominaga, M.; Rosen, T. A.; Levine, J. D.; Julius, D. (1997): The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. In: *Nature* 389 (6653), S. 816–824. DOI: 10.1038/39807.

Caulfield, M. P. (1993): Muscarinic Receptors? Characterization, coupling and function. In: *Pharmacology & Therapeutics* 58 (3), S. 319–379. DOI: 10.1016/0163-7258(93)90027-B.

Caulfield, M. P.; Birdsall, N. J. (1998): International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. In: *Pharmacological reviews* 50 (2), S. 279–290.

Chávez, Jaime; Vargas, Mario H.; Cruz-Valderrama, José E.; Montañó, Luis M. (2011): Non-quantal release of acetylcholine in guinea-pig airways: role of choline transporter. In: *Experimental physiology* 96 (4), S. 460–467. DOI: 10.1113/expphysiol.2010.056440.

Colović, Mirjana B.; Krstić, Danijela Z.; Lazarević-Pašti, Tamara D.; Bondžić, Aleksandra M.; Vasić, Vesna M. (2013): Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. In: *Current neuropharmacology* 11 (3), S. 315–335. DOI: 10.2174/1570159X11311030006.

Corringer, Pierre-Jean; Sallette, Jérôme; Changeux, Jean-Pierre (2006): Nicotine enhances intracellular nicotinic receptor maturation: a novel mechanism of neural plasticity? In: *Journal of physiology, Paris* 99 (2-3), S. 162–171. DOI: 10.1016/j.jphysparis.2005.12.012.

Corsetti, V.; Mozzetta, C.; Biagioni, S.; Augusti Tocco, G.; Tata, A. M. (2012): The mechanisms and possible sites of acetylcholine release during chick primary sensory neuron differentiation. In: *Life sciences* 91 (15-16), S. 783–788. DOI: 10.1016/j.lfs.2012.08.026.

Cruse, Glenn; Bradding, Peter (2016): Mast cells in airway diseases and interstitial lung disease. In: *European journal of pharmacology* 778, S. 125–138. DOI: 10.1016/j.ejphar.2015.04.046.

- Dalsgaard, C.-J.; Lundberg, J. M. (1984): Evidence for a spinal afferent innervation of the guinea pig lower respiratory tract as studied by the horseradish peroxidase technique. In: *Neuroscience letters* 45 (2), S. 117–122. DOI: 10.1016/0304-3940(84)90085-5.
- Darvesh, Sultan; Hopkins, David A.; Geula, Changiz (2003): Neurobiology of butyrylcholinesterase. In: *Nature reviews. Neuroscience* 4 (2), S. 131–138. DOI: 10.1038/nrn1035.
- Düring, M. von; Andres, K. H. (1988): Structure and functional anatomy of visceroreceptors in the mammalian respiratory system. In: *Progress in brain research* 74, S. 139–154.
- Eglen, R. M.; Hegde, S. S.; Watson, N. (1996): Muscarinic receptor subtypes and smooth muscle function. In: *Pharmacological reviews* 48 (4), S. 531–565.
- Erickson, J. D.; Varoqui, H.; Schäfer, M. K.; Modi, W.; Diebler, M. F.; Weihe, E. et al. (1994): Functional identification of a vesicular acetylcholine transporter and its expression from a "cholinergic" gene locus. In: *The Journal of Biological Chemistry* 269 (35), S. 21929–21932.
- Fryer, A. D.; Jacoby, D. B. (1998): Muscarinic receptors and control of airway smooth muscle. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 158 (5 Pt 3), S. 60. DOI: 10.1164/ajrccm.158.supplement_2.13tac120.
- Fucile, Sergio (2004): Ca²⁺ permeability of nicotinic acetylcholine receptors. In: *Cell calcium* 35 (1), S. 1–8. DOI: 10.1016/j.ceca.2003.08.006.
- Gotti, C.; Clementi, F. (2004): Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. In: *Progress in neurobiology* 74 (6), S. 363–396. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2004.09.006.
- Gotti, Cecilia; Clementi, Francesco; Fornari, Alice; Gaimarri, Annalisa; Guiducci, Stefania; Manfredi, Irene et al. (2009): Structural and functional diversity of native brain neuronal nicotinic receptors. In: *Biochemical pharmacology* 78 (7), S. 703–711. DOI: 10.1016/j.bcp.2009.05.024.
- Grando, S. A.; Kist, D. A.; Qi, M.; Dahl, M. V. (1993): Human keratinocytes synthesize, secrete, and degrade acetylcholine. In: *The Journal of investigative dermatology* 101 (1), S. 32–36.

- Haberberger, R. V.; Bodenbenner, M.; Kummer, W. (2000): Expression of the cholinergic gene locus in pulmonary arterial endothelial cells. In: *Histochemistry and cell biology* 113 (5), S. 379–387. DOI: 10.1007/s004180000153.
- Hadziefendic, S.; Haxhiu, M. A. (1999): CNS innervation of vagal preganglionic neurons controlling peripheral airways: a transneuronal labeling study using pseudorabies virus. In: *Journal of the autonomic nervous system* 76 (2-3), S. 135–145. DOI: 10.1016/s0165-1838(99)00020-x.
- Haga, Tatsuya (2014): Molecular properties of the high-affinity choline transporter CHT1. In: *Journal of biochemistry* 156 (4), S. 181–194. DOI: 10.1093/jb/mvu047.
- Haxhiu, M. A.; Jansen, A. S.; Cherniack, N. S.; Loewy, A. D. (1993): CNS innervation of airway-related parasympathetic preganglionic neurons: a transneuronal labeling study using pseudorabies virus. In: *Brain research* 618 (1), S. 115–134.
- Hone, Arik J.; Servent, Denis; McIntosh, J. Michael (2018): $\alpha 9$ -containing nicotinic acetylcholine receptors and the modulation of pain. In: *British journal of pharmacology* 175 (11), S. 1915–1927. DOI: 10.1111/bph.13931.
- Israël, Maurice; Dunant, Yves (1999): Mediatophore, a protein supporting quantal acetylcholine release. In: *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 77 (9), S. 689–698. DOI: 10.1139/cjpp-77-9-689.
- Karemaker, John M. (2017): An introduction into autonomic nervous function. In: *Physiological measurement* 38 (5), R89-R118. DOI: 10.1088/1361-6579/aa6782.
- Katz, B. (1971): Quantal mechanism of neural transmitter release. In: *Science (New York, N.Y.)* 173 (3992), S. 123–126. DOI: 10.1126/science.173.3992.123.
- Kawashima, K.; Fujii, T.; Watanabe, Y.; Misawa, H. (1998): Acetylcholine synthesis and muscarinic receptor subtype mRNA expression in T-lymphocytes. In: *Life sciences* 62 (17-18), S. 1701–1705. DOI: 10.1016/S0024-3205(98)00131-3.
- Kawashima, Koichiro; Yoshikawa, Ken; Fujii, Yoshihito X.; Moriwaki, Yasuhiro; Misawa, Hidemi (2007): Expression and function of genes encoding cholinergic components in murine immune cells. In: *Life sciences* 80 (24-25), S. 2314–2319. DOI: 10.1016/j.lfs.2007.02.036.

Kistemaker, Loes E. M.; Gosens, Reinoud (2015): Acetylcholine beyond bronchoconstriction: roles in inflammation and remodeling. In: *Trends in Pharmacological Sciences* 36 (3), S. 164–171. DOI: 10.1016/j.tips.2014.11.005.

Klapproth, H.; Reinheimer, T.; Metzen, J.; Münch, M.; Bittinger, F.; Kirkpatrick, C. J. et al. (1997): Non-neuronal acetylcholine, a signalling molecule synthesized by surface cells of rat and man. In: *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 355 (4), S. 515–523.

Klinke, Rainer; Pape, Hans-Christian; Kurtz, Armin; Silbernagl, Stefan; Baumann, Rosemarie; Brenner, Bernhard et al. (2010): Physiologie. 6., vollständig überarb. Aufl. Stuttgart: Thieme. Online verfügbar unter <http://ebooks.thieme.de/9783137960065>.

Koenig, J. A.; Edwardson, J. M. (1996): Intracellular trafficking of the muscarinic acetylcholine receptor: importance of subtype and cell type. In: *Molecular pharmacology* 49 (2), S. 351–359.

Koenig, Jennifer A.; Edwardson, J. Michael (1997): Endocytosis and recycling of G protein-coupled receptors. In: *Trends in Pharmacological Sciences* 18 (8), S. 276–287. DOI: 10.1016/S0165-6147(97)01091-2.

Koepsell, Hermann; Lips, Katrin; Volk, Christopher (2007): Polyspecific organic cation transporters: structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications. In: *Pharmaceutical research* 24 (7), S. 1227–1251. DOI: 10.1007/s11095-007-9254-z.

Koopman, Frieda A.; Stoof, Susanne P.; Straub, Rainer H.; van Maanen, Marjolein A.; Vervoordeldonk, Margriet J.; Tak, Paul P. (2011): Restoring the balance of the autonomic nervous system as an innovative approach to the treatment of rheumatoid arthritis. In: *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)* 17 (9-10), S. 937–948. DOI: 10.2119/molmed.2011.00065.

Krasteva, Gabriela; Canning, Brendan J.; Hartmann, Petra; Veres, Tibor Z.; Papadakis, Tamara; Mühlfeld, Christian et al. (2011): Cholinergic chemosensory cells in the trachea regulate breathing. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (23), S. 9478–9483. DOI: 10.1073/pnas.1019418108.

Krauhs, J. M. (1984): Morphology of presumptive slowly adapting receptors in dog trachea. In: *The Anatomical record* 210 (1), S. 73–85. DOI: 10.1002/ar.1092100111.

Kummer, W.; Fischer, A.; Kurkowski, R.; Heym, C. (1992): The sensory and sympathetic innervation of guinea-pig lung and trachea as studied by retrograde neuronal tracing and double-labelling immunohistochemistry. In: *Neuroscience* 49 (3), S. 715–737.

Kummer, W.; Lips, K. S.; Pfeil, U. (2008): The epithelial cholinergic system of the airways. In: *Histochemistry and cell biology* 130 (2), S. 219–234. DOI: 10.1007/s00418-008-0455-2.

Kummer, W.; Perniß, A.; Bufe, B.; Krasteva-Christ, G. (2016): A Bacterial Signal Peptide Increases Mucociliary Clearance in Explanted Mouse Trachea. In: *Pneumologie* 70 (07). DOI: 10.1055/s-0036-1584616.

Kummer, Wolfgang; Wiegand, Silke; Akinçi, Sibel; Wessler, Ignatz; Schinkel, Alfred H.; Wess, Jürgen et al. (2006): Role of acetylcholine and polyspecific cation transporters in serotonin-induced bronchoconstriction in the mouse. In: *Respiratory research* 7, S. 65. DOI: 10.1186/1465-9921-7-65.

Li, B.; Stribley, J. A.; Ticu, A.; Xie, W.; Schopfer, L. M.; Hammond, P. et al. (2000): Abundant tissue butyrylcholinesterase and its possible function in the acetylcholinesterase knockout mouse. In: *Journal of neurochemistry* 75 (3), S. 1320–1331. DOI: 10.1046/j.1471-4159.2000.751320.x.

Lips, Katrin S.; Lührmann, Anke; Tschernig, Thomas; Stoeger, Tobias; Alessandrini, Francesca; Grau, Veronika et al. (2007a): Down-regulation of the non-neuronal acetylcholine synthesis and release machinery in acute allergic airway inflammation of rat and mouse. In: *Life sciences* 80 (24-25), S. 2263–2269. DOI: 10.1016/j.lfs.2007.01.026.

Lips, Katrin S.; Wunsch, Julia; Zarghooni, Shirin; Bschiepfer, Thomas; Schukowski, Konstantin; Weidner, Wolfgang et al. (2007b): Acetylcholine and molecular components of its synthesis and release machinery in the urothelium. In: *European urology* 51 (4), S. 1042–1053. DOI: 10.1016/j.eururo.2006.10.028.

Luck, J. C. (1970): Afferent vagal fibres with an expiratory discharge in the rabbit. In: *The Journal of physiology* 211 (1), S. 63–71. DOI: 10.1113/jphysiol.1970.sp009266.

Lüllmann-Rauch (2003): Taschenlehrbuch Histologie. 3. Aufl. Kiel.

Michel, Vera; Yuan, Zongfei; Ramsubir, Shobha; Bakovic, Marica (2006): Choline transport for phospholipid synthesis. In: *Experimental biology and medicine* (Maywood, N.J.) 231 (5), S. 490–504.

Milara, Javier; Cervera, Angela; Diego, Alfredo de; Sanz, Celia; Juan, Gustavo; Gavaldà, Amadeu et al. (2016): Non-neuronal cholinergic system contributes to corticosteroid resistance in chronic obstructive pulmonary disease patients. In: *Respiratory research* 17 (1), S. 145. DOI: 10.1186/s12931-016-0467-8.

Mishina, M.; Takai, T.; Imoto, K.; Noda, M.; Takahashi, T.; Numa, S. et al. (1986): Molecular distinction between fetal and adult forms of muscle acetylcholine receptor. In: *Nature* 321 (6068), S. 406–411. DOI: 10.1038/321406a0.

Morel, N. (2003): Neurotransmitter release: the dark side of the vacuolar-H⁺ATPase. In: *Biology of the Cell* 95 (7), S. 453–457. DOI: 10.1016/S0248-4900(03)00075-3.

Nassenstein, Christina; Taylor-Clark, Thomas E.; Myers, Allen C.; Ru, Fei; Nandigama, Rajender; Bettner, Weston; Udem, Bradley J. (2010): Phenotypic distinctions between neural crest and placodal derived vagal C-fibres in mouse lungs. In: *The Journal of physiology* 588 (Pt 23), S. 4769–4783. DOI: 10.1113/jphysiol.2010.195339.

Nassenstein, Christina; Wiegand, Silke; Lips, Katrin S.; Li, Guanfeng; Klein, Jochen; Kummer, Wolfgang (2015): Cholinergic activation of the murine trachealis muscle via non-vesicular acetylcholine release involving low-affinity choline transporters. In: *International immunopharmacology* 29 (1), S. 173–180. DOI: 10.1016/j.intimp.2015.08.007.

Nigam, P. K.; Nigam, Anjana (2010): Botulinum toxin. In: *Indian J Dermatol* 55 (1), S. 8–14. DOI: 10.4103/0019-5154.60343.

O'Mullane, Lauren M.; Keast, Janet R.; Osborne, Peregrine B. (2013): Co-cultures provide a new tool to probe communication between adult sensory neurons and urothelium. In: *The Journal of urology* 190 (2), S. 737–745. DOI: 10.1016/j.juro.2013.01.048.

O'Regan, S.; Traiffort, E.; Ruat, M.; Cha, N.; Compaore, D.; Meunier, F. M. (2000): An electric lobe suppressor for a yeast choline transport mutation belongs to a new family of transporter-like proteins. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (4), S. 1835–1840. DOI: 10.1073/pnas.030339697.

Parnavelas, J. G.; Kelly, W.; Burnstock, G. (1985): Ultrastructural localization of choline acetyltransferase in vascular endothelial cells in rat brain. In: *Nature* 316 (6030), S. 724–725. DOI: 10.1038/316724a0.

Pedersen, Stine Falsig; Owsianik, Grzegorz; Nilius, Bernd (2005): TRP channels: an overview. In: *Cell calcium* 38 (3-4), S. 233–252. DOI: 10.1016/j.ceca.2005.06.028.

Perniss, Alexander; Liu, Shuya; Boonen, Brett; Keshavarz, Maryam; Ruppert, Anna-Lena; Timm, Thomas et al. (2020): Chemosensory Cell-Derived Acetylcholine Drives Tracheal Mucociliary Clearance in Response to Virulence-Associated Formyl Peptides. In: *Immunity* 52 (4), 683-699.e11. DOI: 10.1016/j.immuni.2020.03.005.

Pfeil, Uwe; Lips, Katrin Susanne; Eberling, Lars; Grau, Veronika; Haberberger, Rainer Viktor; Kummer, Wolfgang (2003): Expression of the high-affinity choline transporter, CHT1, in the rat trachea. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* 28 (4), S. 473–477. DOI: 10.1165/rcmb.2002-0190OC.

Reinheimer, T.; Baumgärtner, D.; Höhle, K. D.; Racké, K.; Wessler, I. (1997): Acetylcholine via muscarinic receptors inhibits histamine release from human isolated bronchi. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 156 (2 Pt 1), S. 389–395. DOI: 10.1164/ajrccm.156.2.96-12079.

Renz-Polster, Herbert; Krautzig, Steffen; Bätge, Boris; Stoll, Matthias (Hg.) (2013): Basislehrbuch Innere Medizin. Kompakt - greifbar - verständlich ; [Plus im Web, mediscript. 5. Auflage. München: Elsevier Urban & Fischer.

Rodriguez-Diaz, Rayner; Dando, Robin; Huang, Y. Anthony; Berggren, Per-Olof; Roper, Stephen D.; Caicedo, Alejandro (2012): Real-time detection of acetylcholine release from the human endocrine pancreas. In: *Nature protocols* 7 (6), S. 1015–1023. DOI: 10.1038/nprot.2012.040.

Rodriguez-Diaz, Rayner; Dando, Robin; Jacques-Silva, M. Caroline; Fachado, Alberto; Molina, Judith; Abdulreda, Midhat H. et al. (2011): Alpha cells secrete acetylcholine as a non-neuronal paracrine signal priming beta cell function in humans. In: *Nature medicine* 17 (7), S. 888–892. DOI: 10.1038/nm.2371.

Scudamore, Cheryl L. (2014): A practical guide to the histology of the mouse. Chichester, West Sussex, UK: Wiley Blackwell. Online verfügbar unter <http://gbv.ebib.com/patron/FullRecord.aspx?p=1584994>.

Small, R. C.; Good, D. M.; Dixon, J. S.; Kennedy, I. (1990): The effects of epithelium removal on the actions of cholinomimetic drugs in opened segments and perfused tubular preparations of guinea-pig trachea. In: *British journal of pharmacology* 100 (3), S. 516–522.

Song, Pingfang; Rekow, Stephen S.; Singleton, Corey-Ayne; Sekhon, Harmanjatinder S.; Dissen, Gregory A.; Zhou, Minerva et al. (2013): Choline transporter-like protein 4 (CTL4) links to non-neuronal acetylcholine synthesis. In: *Journal of neurochemistry* 126 (4), S. 451–461. DOI: 10.1111/jnc.12298.

Springall, D. R.; Cadieux, A.; Oliveira, H.; Su, H.; Royston, D.; Polak, J. M. (1987): Retrograde tracing shows that CGRP-immunoreactive nerves of rat trachea and lung originate from vagal and dorsal root ganglia. In: *Journal of the autonomic nervous system* 20 (2), S. 155–166.

Traiffort, E.; Ruat, M.; O'Regan, S.; Meunier, F. M. (2005): Molecular characterization of the family of choline transporter-like proteins and their splice variants. In: *Journal of neurochemistry* 92 (5), S. 1116–1125. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2004.02962.x.

Tuček, Stanislav (1982): The synthesis of acetylcholine in skeletal muscles of the rat. In: *The Journal of physiology* 322, S. 53–69.

Ukena, Dieter; Fishman, Liat; Niebling, Wilhelm-Bernhard (2008): Bronchial asthma: diagnosis and long-term treatment in adults. In: *Deutsches Ärzteblatt International* 105 (21), S. 385–394. DOI: 10.3238/arztebl.2008.0385.

Vetter, Douglas E.; Liberman, M.Charles; Mann, Jeffrey; Barhanin, Jacques; Boulter, Jim; Brown, M.Christian et al. (1999): Role of $\alpha 9$ Nicotinic ACh Receptor Subunits in the Development and Function of Cochlear Efferent Innervation. In: *Neuron* 23 (1), S. 93–103. DOI: 10.1016/S0896-6273(00)80756-4.

Vyskocil, F.; Malomouzh, A. I.; Nikolsky, E. E. (2009): Non-quantal acetylcholine release at the neuromuscular junction. In: *Physiological research* 58 (6), S. 763–784.

Waxenbaum, Joshua A.; Reddy, Vamsi; Varacallo, Matthew (2020): StatPearls. Anatomy, Autonomic Nervous System. Treasure Island (FL).

Welsch, Ulrich; Deller, Thomas (2011): Sobotta Lehrbuch Histologie. Unter Mitarbeit von Thomas Deller. 3. Aufl. s.l.: Urban Fischer Verlag - Lehrbücher. Online verfügbar unter <http://gbv.ebib.com/patron/FullRecord.aspx?p=1722830>.

Welsch, Ulrich; Kummer, Wolfgang; Deller, Thomas (Hg.) (2018): Histologie. Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie: das Lehrbuch. Unter Mitarbeit von Stefan Elsberger. Urban-&-Fischer-Verlag. 5. Auflage. München, Deutschland: Elsevier. Online verfügbar unter <http://shop.elsevier.de/978-3-437-44434-0>.

Wessler, I.; Kirkpatrick, C. J. (2008): Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. In: *British journal of pharmacology* 154 (8), S. 1558–1571. DOI: 10.1038/bjp.2008.185.

Wessler, I.; Kirkpatrick, C. J.; Racké, K. (1999): The cholinergic 'pitfall': acetylcholine, a universal cell molecule in biological systems, including humans. In: *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 26 (3), S. 198–205.

Wessler, I.; Roth, E.; Deutsch, C.; Brockerhoff, P.; Bittinger, F.; Kirkpatrick, C. J.; Kilbinger, H. (2001): Release of non-neuronal acetylcholine from the isolated human placenta is mediated by organic cation transporters. In: *British journal of pharmacology* 134 (5), S. 951–956. DOI: 10.1038/sj.bjp.0704335.

Wessler, I. K.; Kirkpatrick, C. J. (2001): The Non-neuronal cholinergic system: an emerging drug target in the airways. In: *Pulmonary pharmacology & therapeutics* 14 (6), S. 423–434. DOI: 10.1006/pupt.2001.0313.

Wessler, Ignaz; Michel-Schmidt, Rosmarie; Schmidt, Harald; Kaltwasser, Susanne; Unger, Ronald; Kirkpatrick, Charles James (2013): Upregulated acetylcholine synthesis during early differentiation in the embryonic stem cell line CGR8. In: *Neuroscience letters* 547, S. 32–36.

Widdicombe, J. G.; Nadel, J. A. (1963): Reflex effects of lung inflation on tracheal volume. In: *Journal of applied physiology* 18, S. 681–686.

Wonnacott, Sue; Bermudez, Isabel; Millar, Neil S.; Tzartos, Socrates J. (2018): Nicotinic acetylcholine receptors. In: *British journal of pharmacology* 175 (11), S. 1785–1788. DOI: 10.1111/bph.14209.

11. Publikationsverzeichnis

Publikationen:

Perniss, Alexander; Liu, Shuya; Boonen, Brett; Keshavarz, Maryam; Ruppert, Anna-Lena; Timm, Thomas; Pfeil, Uwe; Soultanova, Aichurek; Kusumakshi, Soumya; Delventhal, Lucas; Aydin, Öznur; Pyrski, Martina; Deckmann, Klaus; Hain, Torsten; Schmidt, Nadine; Ewers, Christa; Günther, Andreas; Lochnit, Günter; Chubanov, Vladimir; Gudermann, Thomas; Oberwinkler, Johannes; Klein, Jochen; Mikoshiba, Katsuhiko; Leinders-Zufall, Trese; Offermanns, Stefan; Schütz, Burkhard; Boehm, Ulrich; Zufall, Frank; Bufe, Bernd; Kummer, Wolfgang (2020): **Chemosensory Cell-Derived Acetylcholine Drives Tracheal Mucociliary Clearance in Response to Virulence-Associated Formyl Peptides.** In: *Immunity*, Jahrgang 52,4, S. 683-699.e11

Review:

Audrit, Katrin Julia; Delventhal, Lucas; Aydin, Öznur; Nassenstein, Christina (2017): **The nervous system of airways and its remodeling in inflammatory lung diseases.** In: *Cell and tissue research* 367 (3), S. 571–590. DOI: 10.1007/s00441-016-2559-7.

Poster:

Characterization of cellular sources for non-quantal ACh release in mouse airways (5TH DZL International Symposium, 2016 in Hamburg)

Characterization of cellular sources for non-quantal ACh release in mouse airways (6. DZL-Jahrestreffen, 2017 in München)

Epithelial cells of the murine airways release non-quantal ACh (8. DZL-Jahrestreffen, 2019 in Mannheim)

12. Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehendspezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

13. Danksagung

Ich möchte mich zuallererst sehr herzlich bei Prof. Dr. Wolfgang Kummer und meiner Betreuerin, Dr. Christina Nassenstein, PhD bedanken. Ihr habt mir nicht nur das Thema überlassen, sondern mir auch während meines Freisemesters und den darauffolgenden Jahren bis zur Disputation bei Problemen und Rückfragen mit Rat und Tat zur Seite gestanden.

Ein besonderer Dank gilt allen Kollegen, Mitarbeitern und Doktoranden im Labor und Institut, die mich während den ganzen Jahren begleitet haben. Ihr habt mir nicht nur das Arbeiten im Labor beigebracht, sondern mich auch persönlich reifen lassen.

Besonders möchte ich mich bei Dr. Alexander Perniss für die gute Zusammenarbeit im Labor sowie die interessanten Gespräche und Diskussionen bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei Silke Wiegand, die mich an die Methoden und den Laboralltag herangeführt und mich tatkräftig unterstützte.

Ein großer Dank gilt Claudia Tag, die mich stets unterstützt hat und mir im Labor viel geholfen hat.

Ich möchte mich herzlich bei Tamara Papadakis und Martin Bodenbenner-Türich bedanken, die mir im Labor jederzeit sehr geholfen haben.

Bedanken möchte ich mich auch bei meiner Frau, Christina Delventhal, die während der ganzen Zeit und den vielen Jahren an meiner Seite war und mich immer wieder aufs Neue motiviert hat und mir stets gezeigt hat, wofür ich die Mühen auf mich nehme! Danke für alles!

Und der letzte Dank geht an meine Eltern, Thomas Delventhal und Sigrid Hartlef-Delventhal, und meine Schwester, Lena Delventhal, die immer an mich geglaubt haben und mir die Kraft und das Durchhaltevermögen gegeben haben diese Arbeit zu Ende zu führen.