

**Chemosensitivität von cholinergen urethralen Bürstenzellen jenseits der Wahrnehmung
von bitter, umami und süß**

INAUGURALDISSERTATION

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

Vorgelegt von
Chrissy Galdiga, geb. Kandel
aus Essen

Gießen 2026

Aus dem Fachbereich der Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen
Institut für Anatomie und Zellbiologie
Arbeitsgruppe viszerale Neurobiologie

Gutachter 1: PD Dr. Klaus Deckmann
Gutachter 2: Prof. Dr. med. Florian Wagenlehner
Tag der Disputation: 17.08.2026

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	1
1. Einleitung.....	1
1.1 Anatomie der Urethra und der Harnblase	1
1.1.1 Die Harnblase	1
1.1.2 Die Urethra.....	2
1.2 Gustatorische Transduktionskaskade.....	4
1.2.1 Anatomie der Zunge.....	4
1.2.2 Bitter, süß, umami	5
1.2.3 Salzig	6
1.2.4 Fettig.....	7
1.2.5 Sauer	7
1.3 Extraorale chemosensorische Zellen.....	8
1.4 Ziel der Arbeit.....	9
2 Material und Methoden	10
2.1 Material	10
2.1.1 Tiere.....	10
2.1.2 Primäre Antikörper	11
2.1.3 Sekundäre Antikörper.....	11
2.1.4 Primer	12
2.1.5 Lösungen und Puffer	13
2.2 Methoden	15
2.2.1 Tötung der Mäuse	15
2.2.2 Probengewinnung und -verarbeitung für die Immunhistochemie	15
2.2.3 Immunhistochemie	16
2.2.4 Fluoreszenzmikroskopische Auswertung.....	17
2.2.5 Gewebevorbereitung für RT-PCR.....	17
2.2.6 Zellisolierung für RT-PCR, Calciummessungen an isolierten Zellen und Next Generation Sequencing.....	17
2.2.7 RT-PCR	18

2.2.8	Calciummessung an isolierten UBC	19
2.2.9	Next Generation Sequencing	22
2.2.10	Statistik.....	22
3.	Ergebnisse	23
3.1	Fettig.....	23
3.1.1	Expression von Rezeptoren zur Wahrnehmung von fettigen Stimuli.....	23
3.2	Sauer	23
3.2.1	Expression von Rezeptoren zur Wahrnehmung von sauren Stimuli	23
3.3	Salzig	24
3.3.1	Expression von ENaC-Untereinheiten in der Urethra und in UBC	24
3.3.2	Nachweise der ENaC-Untereinheit α in UBC.....	25
3.3.3	$[Ca^{2+}]_i$ - Anstieg als Reaktion auf NaCl	27
3.3.4	Reaktion der $[Ca^{2+}]_i$ auf NaCl im Vergleich mit Mannitol	29
3.3.5	Blockade des ENaC durch Amilorid.....	31
3.4	Polymodalität der UBC	34
3.5	Next Generation Sequencing	35
4.	Diskussion	37
4.1	Sauer und fettig.....	37
4.2	Ist ENaC in UBC vorhanden?	37
4.3	Physiologischer Nutzen der Erkennung von salzigen Stimuli.....	38
5.	Zusammenfassung	40
6.	Summary	41
7.	Abkürzungsverzeichnis	43
8.	Tabellen- und Abbildungsverzeichnis.....	44
a.	Tabellen	44
b.	Abbildungen	44
9.	Literaturverzeichnis.....	45
10.	Publikationsverzeichnis.....	55
11.	Ehrenwörtliche Erklärung	56
12.	Danksagung	57

1. Einleitung

1.1 Anatomie der Urethra und der Harnblase

1.1.1 Die Harnblase

Die Funktion der Harnblase, die einen Teil der ableitenden Harnwege (Abb. 1.1) darstellt, besteht in der Speicherung und periodischen Abgabe des Urins.

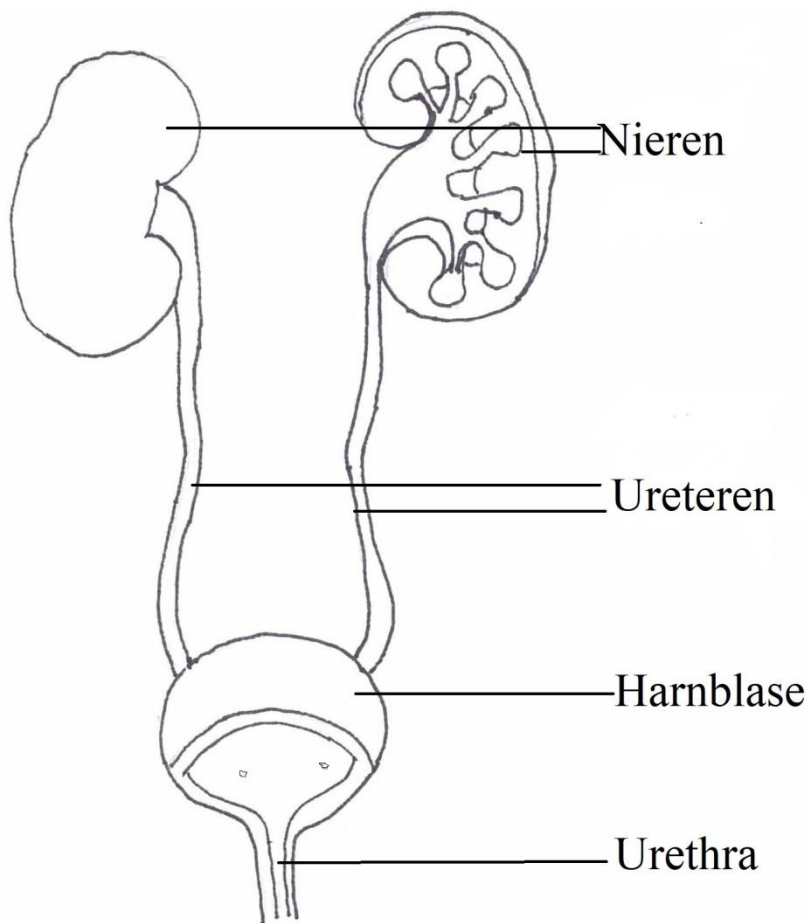


Abbildung 1.1 Ableitende Harnwege

Die ableitenden Harnwege bestehen aus Nierenbecken, Ureteren, Harnblase und Urethra.

Sie liegt extra- bzw. präperitoneal im kleinen Becken und lässt sich in vier Teile unterteilen: Apex, Corpus, Fundus und Cervix. Das Innenrelief besteht aus Schleimhautfalten, die bei zunehmendem Füllungsgrad verstreichen, dem Trigonum vesicae, einem dreieckigen Schleimhautfeld am Blasengrund, das frei von Schleimhautfalten ist, sowie der Uvula vesicae, welche eine zäpfchenartige Erhebung an der Cervix vesicae darstellt und als Abdichtung zur Urethra gilt. Histologisch besteht die Wand der Harnblase aus der innenliegenden Tunica mucosa, der Tunica

muscularis und der Tunica adventitia. Die Tunica mucosa ist aus einem als Urothel bezeichnetem Epithel und der Lamina propria aufgebaut. Die Tunica muscularis besteht aus dem Musculus detrusor vesicae und dem Musculus sphincter vesicae internus. Die Tunica adventitia stellt umgebendes Bindegewebe dar.

Das Urothel wird aus Basalzellen, Intermediärzellen und Deckzellen (engl. umbrella cells) gebildet. Die Funktion dieser Deckzellen ist die Bildung einer Permeabilitätsschranke, die den Durchtritt von Harn und schädlichen Stoffen verhindert (Welsch, 2003) und die Vergrößerung der Oberfläche, um das Blasenvolumen dem Füllungszustand der Harnblase anzupassen. Dieser Mechanismus beruht auf im Zytoplasma befindlichen diskoiden Vesikeln, welche in die apikale Membran eingebaut werden können.

Der Musculus detrusor vesicae besteht aus drei spiralförmig laufenden Schichten glatter Muskulatur. Er ist hauptverantwortlich für die Entleerung der Harnblase. Auch der Musculus sphincter vesicae internus besteht aus glatter Muskulatur, ist aber für das Verschließen der Blase zuständig. Dieser Sphincter internus ist durch den Sympatikus aktiviert, seine Kontraktion geschieht also unwillkürlich. Außerhalb der Harnblase liegt der aus quergestreifter Muskulatur bestehende Musculus sphincter urethrae externus, welcher willkürlich über den Nervus pudendus die Miktion im Sinne eines „Einhaltens“ beeinflusst (Bommas-Ebert et al, 2011).

1.1.2 Die Urethra

Die Harnröhre (Urethra) ist die Verbindung zwischen Harnblase und Außenwelt und liegt subperitoneal. Ihr Eingang ist blasenseitig durch den zuvor genannten Musculus sphincter urethrae internus verschlossen. Sie endet im Ostium urethrae externum. Die Funktion der männlichen Harnröhre besteht sowohl in der Weiterleitung des Urins als auch im Transport des Ejakulats. Das Ejakulat setzt sich aus den in den Hoden gebildeten Spermien und Sekreten zusammen, die in den akzessorischen Geschlechtsdrüsen gebildet werden. Grob kann die männliche Urethra in einen penilen und einen pelvinen Teil unterschieden werden. Zusätzlich wird noch unterteilt in die Pars prostatica, die Pars membranacea und die Pars spongiosa (Abb. 1.2 A). Die Pars prostatica verläuft innerhalb der Prostata und ist der Harnröhrenanteil mit dem größten Durchmesser. Hier befindet sich zudem der Samenhügel (Colliculus seminalis), in dem die beiden Ductus ejaculatorii, die eine Verbindung aus Samenleiter (Ductus deferens) und Ausführungsgang der Bläschendrüse (Ductus excretorius) darstellen, münden. Die Pars membranacea verläuft durch den Beckenboden und wird bei der menschlichen Urethra vom Musculus sphincter urethrae externus umschlossen. Sie stellt den Übergang vom pelvinen zu penilen Anteil der Harnröhre dar. Bei der Maus wird dieser

Übergang durch den Musculus ischiocavernosus und dem Musculus bulbocavernosus definiert (Abb. 1.3 A). Die Pars spongiosa verläuft innerhalb des Corpus spongiosum. Hier verläuft die Urethra an der ventralen Seite des Penis und wird von einem Schwellkörper (Corpus spongiosum penis) umgeben. Kurz bevor die Urethra am Ostium urethrae externum endet, weist sie noch eine Aufweitung, die Fossa navicularis urethrae, auf. Bei Nagetieren gibt es außerdem das Os penis, welches eine knöcherne Struktur darstellt. Das Os penis ist dorsal der Harnröhre gelegen und erstreckt sich mittig von Penisspitze zur Penisbasis (Knoblauch and True, 2012; Treuting and Kowaleska, 2012).

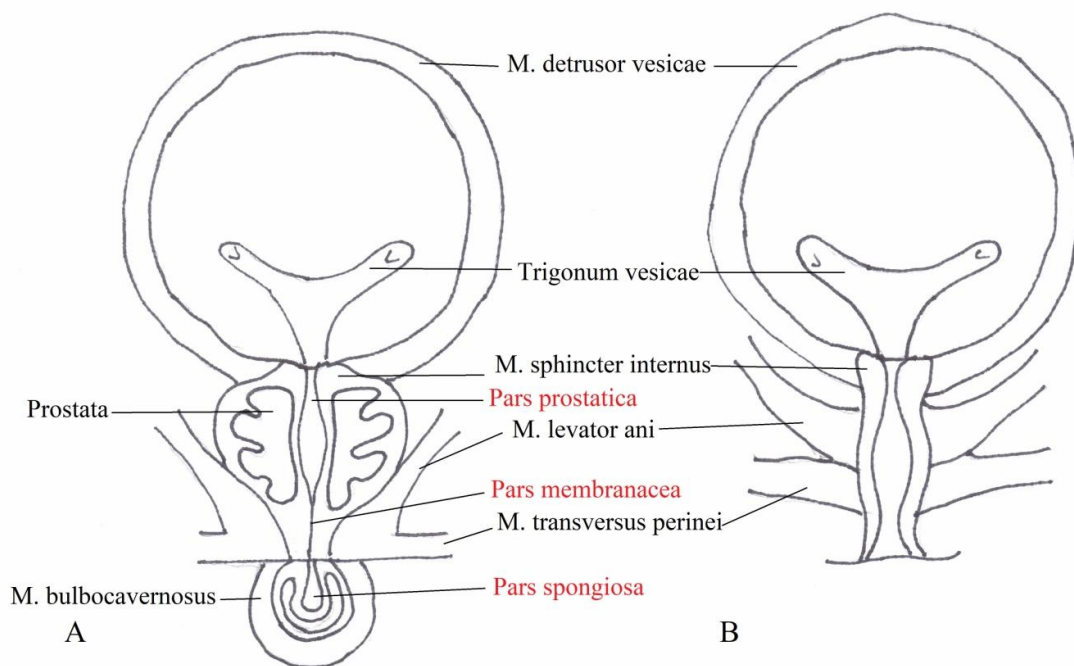


Abbildung 1.2 Menschliche Urethra

(A) Die männliche Urethra besteht aus der Pars prostatica, der Pars membranacea und der Pars spongiosa. (B) Die weibliche Urethra besteht aus der Pars intramuralis und Pars membranacea.

Die Urethra der Frau ist sowohl beim Menschen als auch beim Nagetier kürzer als die des Mannes. Das Ostium urethrae externum liegt in der Fossa clitoridis. Die Harnröhre wird bei Frauen in die Pars intramuralis, die innerhalb der Harnblasenwand verläuft, und die Pars membranacea unterteilt (Abb. 1.2 B und Abb. 1.3 B). Auch beim weiblichen Nagetier gibt es eine dem Os penis ähnliche Struktur, welche zusammen mit der Urethra das Schwellkörpergewebe der Klitoris durchläuft.

Histologisch ist die Wand der Urethra aufgeteilt in Tunica mucosa, Tunica muscularis, bestehend aus schraubenförmig angeordneter glatter Muskulatur, und einer Tunica adventitia. Die Tunica mucosa enthält eine Lamina propria und Epithel. Die Lamina

propria ist eine Bindegewebsschicht mit venösen Gefäßen, das Epithel ist im Verlauf der Harnröhre unterschiedlich aufgebaut: In dem proximal gelegenen Anteil befindet sich, wie in der Harnblase auch, Urothel, die distale Tunica mucosa besteht aus mehrschichtigem, unverhorntem Plattenepithel (Romih et al., 2005).

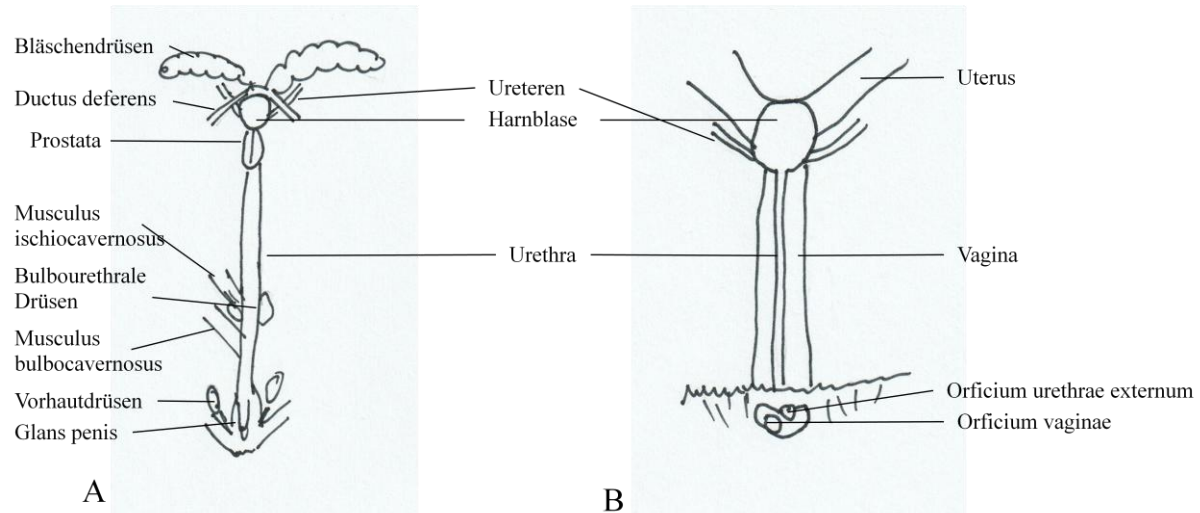


Abbildung 1.3 Murine Urethra

(A) Bei der Maus ist die männliche Urethra in einen pelvinen Anteil und einen penilen Anteil aufgeteilt. (B) Die weibliche murine Urethra hat einen ähnlichen Verlauf wie die menschliche.

1.2 Gustatorische Transduktionskaskade

1.2.1 Anatomie der Zunge

Die Zunge ist ein Muskelorgan, welches in drei Teile unterteilt werden kann: Apex (Spitze), Corpus (Körper) und Radix (Wurzel). In der Mitte verläuft der sulcus terminalis von oral nach aboral, der im Foramen caecum endet. Histologisch besteht die Zunge aus mehrschichtig unverhorntem Plattenepithel und Geschmacksknospen (Abb.1.4).

Letztere sind in sogenannten Papillen formiert. Von diesen gibt es vier verschiedene Arten. Die Papillae filiformes sind für die Wahrnehmung mechanischer Stimuli verantwortlich. Die Papillae fungiformes, foliatae und vallatae hingegen nehmen Geschmäcker wahr. Eine Geschmacksknospe besteht aus den Geschmackssinneszellen oder Geschmackszellen und Basalzellen, sowie afferenten Nervenfasern, über die die Reizweiterleitung erfolgt. In ihnen enden sensorische Nervenfasern des N. glossopharyngeus (Papillae vallatae) und N. facialis (Papillae fungiformes und foliatae). Es gibt drei Typen von Geschmackszellen Typ I, Typ II und Typ III. Typ I Zellen bilden hier eine Gruppe der die Signalkaskade unterstützenden Zellen und haben ähnliche Charakteristika wie Gliazellen (Lawton et al., 2000). Typ II Zellen sind für die Wahrnehmung von bitter, umami und süß zuständig und Typ III Zellen nehmen saure und salzige Stimuli wahr (Lewandowski et al., 2016; Chang et al., 2010).

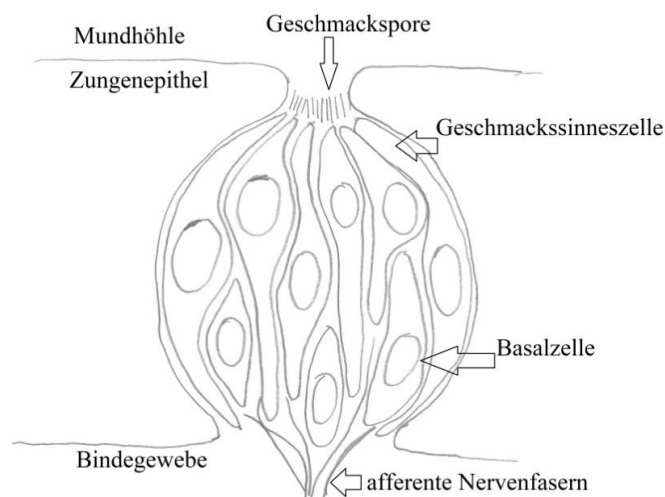


Abbildung 1.4 Geschmacksknospe

Geschmacksknospe bestehend aus den Geschmackssinneszellen und Basalzellen, sowie afferenten Nervenfasern, über die die Reizweiterleitung erfolgt.

Die Papillae circumvallatae findet sich bei Nagetieren auf Höhe des Foramen caecum. Die Funktion der Zunge ist nicht nur die Geschmackswahrnehmung, sondern auch die Zerkleinerung der Nahrung und deren Transport nach aboral, sowie die Artikulation bei Menschen.

1.2.2 Bitter, süß, umami

Bitter, süß, umami, salzig, sauer und fettig sind die sechs von Geschmacksknospen wahrnehmbaren Geschmacksqualitäten (Chaudhari and Roper, 2010) (Abb. 1.5). In Typ II Geschmackszellen in oropharyngealen Geschmacksknospen werden die Qualitäten bitter, süß und umami durch eine Geschmackssignaltransduktionskaskade wahrgenommen. Diese Geschmackssignaltransduktionskaskade beginnt mit an G-Proteine gekoppelte Geschmacksrezeptoren („Taste receptor“, TasR) und beinhaltet außerdem das geschmacksspezifische G-Protein α -Gustducin, Phospholipase C β 2 und den Kationenkanal TRPM5 (Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily M Member 5) (Chaudhari and Roper, 2010). Es kommt zu einer Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration ($[Ca^{2+}]_i$) aus dem endoplasmatischen Retikulum, welches anschließend zur Aktivierung der TRPM5 führt. Hierdurch kann Natrium in die Zelle gelangen, was zur Depolarisation der Zelle führt.

Scnn1b und *Scnn1c* kodiert sind. Auch eine vierte δ -Untereinheit mit eigenständigen Merkmalen wurde identifiziert. Das Vorhandensein dieser Untereinheit ändert den biophysikalischen Charakter sowie die molekulare Regulation dieses Ionenkanals. In Mäusen konnte diese Untereinheit allerdings nicht nachgewiesen werden, sodass die physiologische Funktion zum aktuellen Zeitpunkt noch unklar bleibt (Giraldez et al., 2012; Wichmann et al., 2018). ENaC ist ein konstitutiv aktiver Ionenkanal. Trotzdem sind seine Expression, Dichte in einer Membran, sowie sein Öffnungsverhalten streng durch extrinsische und intrinsische Faktoren reguliert. Dazu gehören Hormone, intrazelluläre Kinasen und intramembrane Lipide sowie die extrazelluläre Natriumkonzentration, pH-Werte und mechanische Stimuli (Chraïbi and Horisberger, 2002; Althaus et al., 2007; Baines, 2013; Kleyman et al., 2018). Die Ionenleitfähigkeit ist auf einwertige Kationen begrenzt ($\text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+$) (Kellenberger und Schild, 2002).

1.2.4 Fettig

Für die Wahrnehmung von LCFA (long chain fatty acids, langkettige Fettsäuren) sind unter anderem die G-Protein gekoppelten Proteine CD36 (Thrombozytenglykoprotein 4) GPR40 (FFAR1, free fatty acid receptor 1) und GPR120 (FFAR4, free fatty acid receptor 4) verantwortlich (Chaudhari and Roper, 2010). Die Aktivierung dieser führt zu einem Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration (Cartoni et al. 2010; DiPatrizio 2014). CD36 ist bei Mäusen überwiegend in den Papillae circumvallatae zu finden (Chevrot et al., 2013). GPR40 findet sich nicht nur in Geschmacksknospen, sondern z. B. auch in den Betazellen der Langerhansinseln des Pankreas, wo es zur Regulierung des Blutzuckers beiträgt (Edfalk et al., 2008).

1.2.5 Sauer

Nichtselektive Kationenkanäle, welche aus polycystic kidney disease 2-like 1 protein (PKD2L1) und polycystic kidney disease 1-like 3 protein (PKD1L3) bestehen, werden als Kandidaten für die Wahrnehmung von sauren Stimuli betrachtet (Huang et al., 2006; Ishimaru et al., 2006; Lopezjimenez et al., 2006; Chaudhari and Roper, 2010). Sie gehören zur Gruppe der TRP-Kanäle (transient receptor potential), werden jedoch nicht in den gleichen Zellen exprimiert, wie TRPM5 (Huang et al., 2006). Weiterhin werden saure Stimuli über Otopetrin-1 wahrgenommen, welches ebenfalls in den Geschmacksknospen von Mäusen nachgewiesen wurde (Zhang et al., 2019).

Sauer, in Form von Wasserstoff-Ionen (H^+), wirkt ebenfalls als Stimulus auf Typ III-Geschmackszellen (Huang et al., 2008).

1.3 Extraorale chemosensorische Zellen

Die in dieser Arbeit untersuchten Zellen sind eine Form von extraoralen chemosensorischen Zellen, welche z. B. im Respirations-, Gastrointestinal- und Urogenitaltrakt beschrieben sind. Diese cholinergen epithelialen Zellen exprimieren Advillin, ein Strukturprotein, das in Mikrovilli zu finden ist. Diese Zellen wurden ursprünglich im Respirationstrakt als „Bürstenzellen“ („brush cells“) bezeichnet, weshalb dieser Begriff zunächst auch für die advillin-positiven, cholinergen, chemosensorischen Zellen der Urethra (urethrale Bürstenzellen, urethral brush cells, UBC) (Deckmann et al., 2014) übernommen wurde. Einige Zeit wurde der Begriff UCCC (urethral cholinergic chemosensory cells) für sie verwendet. Aktuell werden diese Zellen als urethral tuft cells (UTC) bezeichnet. Da diese Arbeit vor der Umbenennung begonnen wurde, wird im weiteren Kontext der Begriff UBC genutzt. Wie auch die Typ II Geschmackszellen enthalten diese Bürstenzellen außerdem die in 1.2.2 beschriebene Geschmackssignaltransduktionskaskade (TasR, α -gustducin, PLC β 2, TRPM5) (Höfer et al., 1996; Höfer and Drenckhahn, 1998; Finger et al., 2003; Krasteva et al., 2011, 2012; Deckmann et al., 2014; Schütz et al., 2015). Am meisten erforscht sind die Bürstenzellen im murinen Gastrointestinaltrakt sowie in murinen Atemwegen. Hier wurde ein Zusammenhang zu einer Immunabwehr in Form einer Interleukin-25 (IL-25)-Sekretion auf Hermithen (mehrzellige endoparasitäre Organismen oder auch „Würmer“) nachgewiesen (Hendel et al., 2022). Weiterhin wird beschrieben, dass sie Cytokeratin-18 (CK18) enthalten, welches auch in reifen Neuronen zu finden ist (Luciano et al., 2003). Sie reagieren auf bittere Substanzen und bakterielle Produkte mit einer Ausschüttung von Acetylcholin (ACh) und initiieren Reflexe, welche an verschiedenen Körperöffnungen als Abwehrmechanismus fungieren (Finger und Kinnamon, 2011; Lee und Cohen, 2015; Deckmann und Kummer, 2016; Perniss et al., 2021). In der Trachea zum Beispiel wird durch die Bürstenzellen bei Exposition mit pathogenen Keimen über ACh eine Erhöhung der Zilienaktivität und somit eine Erhöhung der Partikeltransportgeschwindigkeit erreicht (Perniss et al., 2023). Mit dem „Wächterkonzept“ übereinstimmend ist die Tatsache, dass UBC auf hitze-inaktivierte uropatogene *Escherichia coli* reagieren und eine Verbindung zu Nervenfasern haben (Deckmann et al., 2014). Die Applikation der Bittersubstanz Denatonium in das Urethralumen führt reflexartig zu einer Detrusoraktivität, die auch als protektiver Reflex gedeutet werden kann, da potentiell schädliche Stoffe durch die Miktion aus der Urethra entfernt werden (Deckmann et al., 2014; Kummer und Deckmann, 2017). Zudem konnte vor Kurzem nachgewiesen werden, dass eine TRPM-5 abhängige neurogene Entzündungsreaktion über nikotinische ACh-Rezeptoren auch durch die urethralen BC ausgelöst werden kann

(Schmidt P., 2021). Dies wird als zusätzliche Schutzfunktion interpretiert.

1.4 Ziel der Arbeit

Die meisten cholinergen UBC sind polymodale chemosensorische Zellen, welche sowohl auf bittere Substanzen als auch auf Glutamat mit einer Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration reagieren ($[Ca^{2+}]_i$) (Deckmann et al., 2014). Dies unterscheidet sie von den Typ II-Geschmackszellen, die entweder auf bitter, was einen aversiven Stimulus darstellt, oder auf umami, was einen attraktiven Stimulus darstellt, reagieren (Nelson et al., 2001; Chaudhari and Roper, 2010). An der urethralen Schleimhaut stellen beide Substanzen mögliche schädliche Stoffe dar, da viele bakterielle Produkte bittere Qualitäten haben und freie Aminosäuren (z. B. umami) das Bakterienwachstum im Urin fördern.

Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob UBC dazu in der Lage sind, auf Stimuli mit den Qualitäten fettig, sauer und salzig zu reagieren. Zum einen, um die Datenlage zu ergänzen, und zum anderen um hieraus im Weiteren Hypothesen über eine Veränderung der Miktionsfrequenz bei Konzentrationsänderung des Urins aufstellen zu können.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Tiere

Für die Versuche wurde ein transgener ChAT(Bac)-eGFP-Mausstamm (B6.Cg-Tg(RP23-268L19-EGFP)2Mik/J (ChAT-eGFP); Stock: 00790 RRID: IMSR_JAX:007902) verwendet, bei dem alle ChAT-produzierenden Zellen im Fluoreszenzmikroskop durch ihre grüne Fluoreszenz identifiziert werden können. Dies kommt dadurch zu Stande, dass eine artifizielle Sequenz (Bacterial-Artificial Chromosome = BAC) in das Genom eingeschleust wurde, in der die Expression des verstärkt grünfluoreszierenden Proteins (eGFP) durch den ChAT Promoter getrieben wird (Tallini et al, 2006).

Zudem wurden Mäuse, welche tdTomato, ein hellrot fluoreszierendes Protein, unter dem Promoter von Sodium Channel Epithelial 1 Subunit Alpha (Scnn1a), also der kodierenden Gensequenz der α -Untereinheit des ENaCs, exprimieren, verwendet (Guy et al, 2015). Die tdTomato-Mäuse wurden durch J. Guy und J. Staiger (Institut für Neuroanatomie, Georg-August-Universität Göttingen) zur Verfügung gestellt.

Es wurden sowohl weibliche als auch männliche Mäuse im Alter zwischen 8 und 48 Wochen (n=36) und mit einem Gewicht zwischen 20 g und 50 g verwendet.

Alle Mäuse wurden unter standardisierten spezifiziert pathogen-freien Bedingungen, mit einem 14 zu 10 Stunden Hell-Wach-Rhythmus und Futter- und Wasserversorgung *ad libitum* im Zentralen Tierlabor der Justus-Liebig-Universität gehalten. Die Tiertötung wurden von der lokalen Behörde registriert (Regierungspräsidium Gießen, Deutschland; #A60/2012, #572_M).

2.1.2 Primäre Antikörper

Tabelle 2.1 Liste der verwendeten Primärantikörper

Antigen	Wirt	Verdünnung	Code	Firma	RRID
α -Gustducin	Kaninchen, polyclonal	1:3000	Sc-395	Santa Cruz	AB_673678
ChAT	Ziege, polyclonal	1:250	#2661265	Merck	AB_2314165
PKD2L1	Kaninchen, polyclonal	1:400	Inada et al. 2008		nicht eruiert
GPR120	Kaninchen, polyclonal	1:800	#ab75313	Abcam	AB_1523706
GPR40	Kaninchen, polyclonal	1: 500	#ab75197	Abcam	AB_1523713

2.1.3 Sekundäre Antikörper

Tabelle 2.2 Liste der verwendeten Sekundärantikörper

Antigen	Wirt	Konjugat	Verdünnung	Firma	RRID
Ziegen-IgG	Esel	Cy3	1:800	Chemicon	AB_10978622
Kaninchen-IgG	Esel	Cy3	1:2000	Chemicon	AB_1086399
Ratten-IgG	Esel	Cy3	1:1000	Dianova	AB_2340666
Huhn-IgY	Esel	FITC	1:2000	Dianova	AB_2340356

Cy3 = Cyanin 3, orange fluoreszierend

FITC= Fluorescein

2.1.4 Primer

Tabelle 2.3 Liste der verwendeten Oligonukleotide für die qualitative RT-PCR

Gen	Primer	Basen- paar- länge (bp)	Gendaten- bank- nummer
Scnn1a	Forward GCAGTTTGCTTTGCTGTTTCGAGGA reverse AGACCAGCTTGTCCGAATTGAGGT	82	NM_011324.2
Scnn1b	Forward TCCAGGCCTGTCTTCATTCCTGTT reverse TGGGAAGTCCCTGTTGTTGCAGTA	115	NM_00127202 3.1
Scnn1g	Forward TGACCTGCTTCTTCGATGGGATGT reverse ACTTGCAGACCATACTCACTGCCT	150	NM_011326.3
β2- microglo- bulin	Forward ATTCACCCCCCACTGAGACTG reverse GCTATTTCTTTCTGCGTGCAT	192	NM_009735
β-aktin	Forward GTGGGAATGGGTCAGAAGG reverse GGCATAACAGGGACAGCACA	300	NM_007393.2
eGFP	Forward AAG TTC ATC TGC ACC ACC G reverse TCC TTG AAG AAG ATG GTG CG	180	

2.1.5 Lösungen und Puffer

Aqua ad injectabilia (Ampuwa® (B. Braun, Melsungen, Deutschland)).

Wasser zum Aliquotieren der Substanzen

Dispase

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland

HBSS (Hank's Balanced salt solution)

Life technologies, Carlsbad, Kalifornien

HEPES-Ringer-Puffer

5,6 mM KCl (Kaliumchlorid, Sigma-Aldrich), 136,4 mM NaCl (Natriumchlorid, Carl Roth), 1 mM MgCl₂ (Magnesiumchlorid, Sigma-Aldrich)* 6H₂O, 2,2 mM CaCl₂(Calciumchlorid, Roth)* 2H₂O, 11 mM Glucose (Sigma-Aldrich), 10 mM HEPES (Sigma-Aldrich); eingestellt auf pH 7,4 mit 1 M NaOH (Merck)

Lösung A

31,2 g Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat (Carl Roth, Karlsruhe) werden in einem Liter Aqua dest. gelöst und bei 4°C gelagert.

Lösung B

35,6 g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Carl Roth, Karlsruhe) löst man in einem Liter destillierten Wassers. Bei Raumtemperatur gelagert.

Phosphatpuffer (PP), 0,1 M

115 ml Lösung A und 385 ml Lösung B werden gemischt, 500 ml Aqua dest. hinzugefügt und ein pH-Wert von 7,4 eingestellt.

Phosphate buffered saline (PBS), 0,1 M

137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 12 mM Gesamt-Phosphat (NaCl 8 g, KCl 0,2 g, Na₂HPO₄ 1,42 g (Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat, Carl Roth), KH₂PO₄ 0,27 g (Kaliumdihydrogenphosphat, Sigma Aldrich) auf einen Liter destilliertes H₂O); eingestellt auf pH 7,4 mit 1 M NaOH (Merck)

PBS+S

Die Herstellung ist wie die des PBS, jedoch werden 44,8 g statt 22,4 g Natriumchlorid zugesetzt

Tyrode-III-Puffer

130 mM NaCl, 10 mM HEPES, 10 mM Glucose, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 8 mM CaCl₂, 10 mM Natriumpyruvat, 5 mM NaHCO₃ gelöst in 0,2 M PP, pH 7,4

Paraformaldehyd (PFA) 4 % in 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,2-7,4

40 g Paraformaldehyd auf 500 ml destilliertes H₂O werden langsam auf 70°C erhitzt, dann mit einigen Tropfen 2 M NaOH zu einer klaren Lösung gebracht. Nach Erkalten werden 500 ml 0,2 M PP dazugegeben und der pH auf 7,4 eingestellt. Alle Reagenzien sind von Merck.

Zamboni-Fixans

2% PFA (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) und 15% gesättigter Pikrinsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland) gelöst in 0,1 M PP und auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

Histoblocklösung

Schweineserum (10%), Rinderserum (BSA) (0,1%) und Tween 20 (0,5%; alle von Merck, Darmstadt, Deutschland) wurden in PBS werden gelöst.

Gepuffertes Glycerol

Glycerol und Puffer (50 ml 0,5 M Natriumhydrogencarbonatlösung, mit 0,5 M Dinatriumcarbonat auf pH 8,6 eingestellt; alle Reagenzien von Sigma Aldrich) werden im Verhältnis 2:1 gemischt.

Vorspüllösung

In einem Liter Aqua dest. werden 25 g Polyvinylpyrrolidon (Carl Roth; Karlsruhe), 9 g Natriumchlorid (Carl Roth, Karlsruhe), 2 ml/l Heparin in Wasser (10000 I.E., Ratiopharm, Ulm, Deutschland) und 5 g Procainhydrochlorid (Merck, Darmstadt) gelöst und vermischt (Forssmann et al., 1977). Ein pH-Wert von 7,4 wird eingestellt. Vor dem Gebrauch wird die Lösung durch zwei Membranen mit 3 µm und 0,6 µm großen Poren filtriert.

2.2 Methoden

2.2.1 Tötung der Mäuse

Für die Immunhistochemie und zwecks Zellisolierung für Calciummessung und RT-PCR wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation nach vorausgegangener Inhalation einer Überdosis von Isofluran (Abbott, Wiesbaden, Deutschland) getötet. Danach wurde das Abdomen eröffnet und das Tier mittels Durchtrennung von Aorta und Vena cava inferior ausgeblutet.

Für die Entnahme der Zunge wurde die Mandibula entfernt und die Zunge möglichst weit proximal bzw. aboral herausgetrennt. Das Duodenum wurde entnommen, indem man den Bauchraum öffnete und den ersten Zentimeter aboral des Magens abtrennte und aufarbeitete. Zum Entnehmen der Urethra wurde der Beckenring in der Symphyse getrennt und die Urethra langsam, von der Harnblase beginnend vom umliegenden Bindegewebe gelöst.

2.2.2 Probengewinnung und -verarbeitung für die Immunhistochemie

Für die Immersionsfixierung wurden die Gewebe, Zunge (n=3), Duodenum (n=3) und Urethra (n=6), zunächst entnommen und entweder in Zamboni-Fixans (n=6) oder in 4% Paraformaldehyd (PFA) (Merck) (n=6) fixiert.

Für die Histologie wurden die Tiere auch perfundiert. Hierzu wurden die Mäuse ebenfalls durch Isofluranbetäubung und zervikale Dislokation getötet, allerdings nicht ausgeblutet, sondern der Thorax wurde eröffnet, das Herz freigelegt und über einen Schnitt eine Kanüle in den linken Ventrikel eingebracht. Um das Blut aus dem Kreislauf zu waschen, wurde als nächstes mit einer Vorspüllösung gespült. Daraufhin wurde der Körper entweder mit Zamboni-Fixans oder 4% PFA gelöst in 0,1 M Phosphatpuffer [PP] (bestehend aus 0,2 M Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat und 0,2 M Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat, beides Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland, in Aqua dest., pH 7,4) fixiert und die Zunge (n=4), das Duodenum (n=6) und die Urethra (n=9) entnommen.

Die nicht perfundierten Gewebe blieben zur Immersionsfixierung ca. 24 h in 4% PFA oder in Zamboni-Fixans bei Raumtemperatur auf einer Wippe (Hecht-Assistent, Sondheim v.d. Rhön, Deutschland). Das perfundierte Gewebe hingegen blieb ca. weitere 6 h im jeweiligen Fixans. Das weitere Vorgehen war bei allen Geweben gleich: Es wurde mehrmals täglich für 2-3 Tage mit 0,1 M PP (pH 7,4) gewaschen. Anschließend wurde das Gewebe über Nacht in 18 % Saccharose (Merck, Darmstadt, Deutschland) in 0,1 M PP gelagert. Das Gewebe wurde auf einem Filterpapier

(Whatmen, GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Großbritannien) im Einbettmedium (Tissue-Tek O.C.T. Compound, Sakura, Alphen aan den Rijn, Niederlande) durch Tauchen in durch flüssigen Stickstoff gekühltes Isopentan (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) eingefroren, in Parafilm (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) gewickelt und bei -20°C gelagert. Das Gewebe wurde in 11 µm dicke Kryoschnitte geschnitten (Microm HM 560, MICROM International GmbH, Walldorf, Deutschland) und auf SuperFrost Plus Objektträger (Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland) aufgezogen.

2.2.3 Immunhistochemie

Das bei 4°C auf die Objektträger gezogene Gewebe wurde eine Stunde bei Raumtemperatur trocknen gelassen und anschließend, um unspezifische Proteinbindungsstellen abzusättigen, mit einer Blocklösung bestehend aus 10% Pferdeserum (PAA, Cölbe, Deutschland), 0,5% Tween 20 (Aldrich, Steinheim, Deutschland) und 10% Rinderserumalbumin (BSA; Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland) in PBS+S (0,005 M PP, pH 7,4, mit 44,8 g NaCl) bedeckt. Daraufhin wurden die Schnitte mit den Primärantikörpern (siehe Tabelle 2.1.2) entsprechend der zuvor an Positivkontrollen ermittelten optimalen Konzentrationen, verdünnt mit PBS mit doppeltem Salzgehalt (PBS+S), benetzt und über Nacht in einer dunklen, feuchten Kammer inkubiert. Um die Spezifität der Sekundärantikörper zu prüfen, wurde eine Gruppe mit PBS+S anstatt mit Primärantikörpern benetzt. Die Antikörper wurden außerdem an Positivkontrollen, also an Geweben, in denen der Antikörper bereits sicher nachgewiesen wurde, getestet. Zusätzlich wurde bei vielen Schnitten DAPI, welches ein DNA-bindender Farbstoff ist, zugesetzt, sodass Zellkerne blau fluoreszierten.

Nach einer Inkubationszeit von 12-24 Stunden wurde die Lösung mit Hilfe einer Pumpe abgesaugt und zum vollständigen Entfernen nicht gebundener Antikörper zweimal für 10 min in eine mit PBS gefüllte Küvette gestellt. Die Schnitte wurden daraufhin mit in PBS+S gelösten Sekundärantikörpern (siehe Tabelle 2.1.3) benetzt und eine Stunde in einer dunklen, feuchten Kammer bei 30°C inkubiert. Daraufhin wurden die Schnitte erneut für zweimal 10 min in einer Küvette mit PBS+S gewaschen und in 4% PFA für 10 min fixiert. Nach erneutem Waschen der Schnitte für zweimal 10 min in PBS wurden diese mit 30 µl carbonatgepufferten Glycerol (1:1, pH 8,6) benetzt und mit Deckgläsern bedeckt.

2.2.4 Fluoreszenzmikroskopische Auswertung

Die Auswertung der angefertigten immunhistochemischen Schnitte erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop (Axioplan 2 Imaging mot, Carl Zeiss AG, Göttingen, Deutschland). Die für die Fluorophore FITC, DAPI, und Cy3 verwendeten Filter sind in Tabelle 2.5 charakterisiert. Die fluoreszenzmarkierten Zellen wurden aufgesucht und mit Hilfe des Programms Axio Vision 4.8.2 (Carl ZeissVision GmbH, Göttingen, Deutschland) fotografiert. Hierbei suchte man die Zellen, die sowohl im 460-490 nm als auch im 525-556 nm Filter reagierten.

Tabelle 2.4 Verwendete Filter für das Fluoreszenzmikroskop

Fluorochrom	Anregungsfilter (nm)	Dichroischer Spiegel (nm)	Sperrfilter (nm)
DAPI	340-380	400	435-685
Cy3	525-556	555	570-650
FITC	460-490	505	515-550

2.2.5 Gewebevorbereitung für RT-PCR

Für RT-PCR Untersuchungen am Gesamtgewebe wurden, nachdem die Mäuse (n=6) getötet und die Urethra sowie die Niere präpariert waren, die Organe in Lysispuffer (RLT-Puffer, Qiagen, Hilden, Deutschland) mit 1% β -Mercaptoethanol (Invitrogen) überführt. Das Gewebe wurde anschließend durch eine Kugelmühle (MM 300, Retsch, Haan) 3 min lang bei 30 bps (Schüttelschritte pro Sekunde) zerkleinert.

2.2.6 Zellisolierung für RT-PCR, Calciummessungen an isolierten Zellen und Next Generation Sequencing

Zur Zellisolierung für Calciummessung an isolierten UBC, RT-PCR und Next Generation Sequencing an UBC wurden die Urethrae (n=19 bzw. n=6) sofort nach Entnahme in Dispase, gelöst in HBSS, gegeben und 30 min bei 37°C im Temperierbad (Frigomix 1496, B. Braun, Melsungen, Deutschland) inkubiert. Anschließend wurde das Gewebe mit einer Pipette dissoziiert und 5 min bei 600 rpm zentrifugiert (Heraeus Sepatech, Hanau, Deutschland). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in einer Mischung aus Trypsin (Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland) und PBS (Verhältnis 1:1) 5 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert und anschließend erneut dissoziiert. Diese Mischung wurde erneut 5 min bei 600 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in PBS gewaschen. Die Zellsuspension wurde anschließend durch ein 70 μ m Sieb (BD, Bedford, USA) laufen gelassen und das übrig gebliebene Material erneut

5 min bei 600 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Zur Zellisolierung wurden ChAT-eGFP Mäuse verwendet. Der ChAT-Promotor ist in cholinergen chemosensorischen Zellen dieser Tiere konstitutiv aktiv (Tallini et al., 2006). Daher exprimieren die UBC konstitutiv eGFP, weshalb es möglich ist, die UBC mittels Durchflusszytometrie zu identifizieren und anzureichern bzw. sie mit einem Fluoreszenzmikroskop zu identifizieren. Die Sortierung mittels Durchflusszytometrie erfolge in Zusammenarbeit mit der FACS Core Facility der Justus-Liebig-Universität Gießen.

2.2.7 RT-PCR

Mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen) wurde die RNA aus Gewebe oder aus isolierten und sortierten Zellen isoliert und ihre Konzentration fotometrisch bestimmt und dann auf 1 µg/µl Ampuwa® verdünnt.

Genomische DNA wurde durch einen DNase-Verdau abgebaut, bei dem zunächst 1 µg/µl der isolierten DNA, 1 µl DNase-I /1U/µl (Invitrogen), 1 µl 10x DNase I Reaction Buffer (Invitrogen) und 8 µl Ampuwa® für 15 min bei 25 °C inkubiert wurden. Anschließend wurde 1 µl Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA; 25 mM, pH 8,0, Invitrogen) zugegeben und die DNase für 10 min bei 65 °C aktiviert.

Um die mRNA in cDNA umzuschreiben, wurde der Ansatz mit 1 µl Oligo-dTS (0,5 µg/µl, Eurofins MWG Operon) gemischt und für 10 min bei 65 °C inkubiert. Nachdem dies 5 min auf Eis gekühlt wurde, wurden 4 µl 5x First Strand Buffer (Qiagen), 1 µl dNTP-Mix (10 mM, Qiagen) und 2 µl Dithiothreitol (DTT, 0,1 M; Invitrogen) hinzugegeben. Dieses Gemisch wurde für 2 min auf 42 °C erhitzt. Daraufhin wurde 1 µl Superscript II Reverse Transkriptase (100 U/µl, Qiagen) hinzugegeben und bei 42 °C für 50 min inkubiert. Der Ansatz wurde schließlich für 10 min bei 72 °C erhitzt, um die reverse Transkriptase zu inaktivieren.

Es wurde jeweils 1 µl cDNA mit 0,5 µl eines intronspannenden Forward- und Reverseprimerpaares (Primer siehe Tabelle 2.4), sowie 0,5 µl 10x PCR Buffer II, 2 µl MgCl₂, 0,5 µl dNTPs (10 mM), 0,1 µl AmpliTaq (5 U/µl, alle verwendeten Reagenzien von Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) und 17,9 µl H₂O hinzugegeben. Die Amplifikation erfolgte in einem Thermocycler (Eppendorf Mastercycler Personal, Hamburg) nachfolgendem Protokoll: Die Doppelstrang-DNA wurde durch zwölfminütiges Erhitzen auf 95 °C geschmolzen und dadurch das Enzym AmpliTaq Gold Polymerase aktiviert. Anschließend wurden 40 Zyklen durchlaufen, die folgenden Ablauf und Temperaturen hatten: 30 s bei 95°C, um die Doppelstrang-DNA zu schmelzen, 30 s bei 58-61°C (spezifische Anlagerungstemperatur für jedes Primerpaar), 30 s bei 72°C zur DNA-Synthese. Daraufhin wurde, um die noch nicht

abgeschlossene Synthese von DNA-Fragmenten abzuschließen, die Temperatur bei 72°C für 7 min gehalten. Durch eine Elektrophorese in einem 2% TRIS-Azetat-EDTA-Agarose-Gel (20 g/l Agarose (Genagarose L.E.; iNNO-TRAIN Diagnostik GmbH, Kronberg, Deutschland), 482 g/l TRIS (USB, Cleveland, USA), 104,2 ml/l Eisessig (Merck, Darmstadt, Deutschland), 200 ml/l 0,5 M EDTA (Invitrogen), ad 1 l H₂O) wurde die Größe der PCR-Produkte überprüft. Es wurden 25 µl der PCR-Produkte mit 5 µl Ladepuffer (0,1 g Orange dye; (Sigma), 5,88 ml 87%iges Glycerol (Sigma), 250 µl TRIS-HCl-Puffer (pH 8,0), 1 ml EDTA-Lösung (pH 8,0; Sigma), ad 10 ml H₂O) vermischt und in das Gel aufgetragen. Durch eine horizontale Elektrophorese in einer Peqlab-Kammer (Modell 40-1410, Peqlab, Erlangen, Deutschland wurden die PCR-Produkte) für 45 min mit einer Spannung von 150 V aufgetrennt. Als Marker dienten 10 µl 100 bp DNA Ladder (Invitrogen). UV-Licht (Renner, Deutschland) wurde benutzt, um die PCR-Fragmente zu detektieren. Wasser statt cDNA diente als Kontrolle, ob die AmpliTaq-Lösung mit DNA verunreinigt war. Es wurden Reaktionen mit einem Primerpaar β 2-Mikroglobulin durchgeführt, um den Erfolg der RNA-Isolierung und cDNA-Synthese zu überprüfen.

2.2.8 Calciummessung an isolierten UBC

Auf das nach der in 2.2.6 beschriebenen Zellisolierung übrig gebliebene Zellpellet wurde ein Gemisch aus 6 µl Calcium Orange® (Life Technologies, Oregon, USA) (gelöst in 50 µl DMSO) (Dimethylsulfoxid, Sigma Aldrich), 60 µl Bromsulphophthalein (Merck), 1 µl Pluronic® F-127 (Merck) und Tyrode-III-Puffer (130 mM NaCl, 10 mM HEPES, 10 mM Glucose, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 8 mM CaCl₂, 10 mM Natriumpyruvat, 5 mM NaHCO₃ gelöst in 0,2 M PP, pH 7,4) gegeben.

Auf Deckgläser (Durchmesser 30 mm, Thermo Scientific) wurde eine Mischung aus 3 µl Cell-Tak (Corning Inc), 12 µl 2 M Natriumcarbonat und 0,45 µl 2-Propanol gegeben und zum Trocknen in einen Trockenschrank ausgelegt. Anschließend wurden die Deckgläser zweimalig mit Aqua dest. (Fresenius Kabi) gewaschen und erneut zum Trocknen in den Trockenschrank gelegt. Die Zellsuspension, gemischt mit dem Calcium Orange®, wurde auf die trockenen Deckgläser aufgetragen und in eine feuchte Kammer 60 min bei 30°C zum Inkubieren und Adhärenz gestellt.

Danach wurden die Deckgläser in die Messkammer eingespannt und diese mit Tyrode-III-Puffer gefüllt. Während der gesamten Messung wurde frischer Tyrode-III-Puffer mit einer Geschwindigkeit von 2,5 ml/min in die Kammer hineingepumpt und gleichzeitig der mit Substanzen versetzte Puffer abgesaugt. Die Applikation wurden unter

kontinuierlichem Fluss von Tyrode III in die Kammer gegeben, so dass die angegebenen Konzentrationen zunächst erreicht und dann ausgewaschen wurden.

Die NaCl-Konzentrationsänderungen sind zusätzlich zur Basislinie der Konzentrationen in Tyrode III angegeben. Da die Grundlinienkonzentration von Na^+ im Puffer 145 mM betrug, lag die Gesamtkonzentration nach Zugabe von 1-150 mM im Bereich von 146 bis 295 mM. Gemessen wurde an einem CLSM (Konfokales Laser-Scanning Mikroskop) der Firma Carl Zeiss (LSM 710 with ZEN 2010 B SP1, Zeiss, Wetzlar, Germany). Verwendete Anregungswellenlängen sind in Tabelle 2.6 aufgeführt. UBC wurden durch ihre grüne Eigenfluoreszenz (ChAT-Reportermäuse, siehe oben) detektiert und anschließend wurden verschiedene Substanzen nach den in Abbildung 2.1 und 2.2 gezeigten Schemata in die Kammer hinzugegeben, um dann die Veränderung des intrazellulären Calciumgehaltes als Reaktion auf die Substanz zu messen. Eine Stimulation mit 0,5 mM Adenosintriphosphat (ATP, Sigma-Aldrich) stellte hier die Positivkontrolle dar, da es ein bekannter Neurotransmitter ist. Natriumchlorid (NaCl ; Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) wurde als salziger Stimulus verwendet. Mannitol (Sigma Aldrich,) wurde in äquivalenten Konzentrationen hinzugegeben, um einen auf Osmolarität beruhenden Effekt zu testen. Der Blocker des epithelialen Natriumkanals ENaC Amilorid-hydrochlorid Hydrat (0,01-100 μM ; Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland) wurde als Inhibitor zur Funktionskontrolle verwendet.

Tabelle 2.5 Am CLSM verwendete Anregungswellenlängen

Laser	Anregungswellenlängen (nm)
DPSS (diode pumped solid state)	561
HeNe (Helium Neon)	633

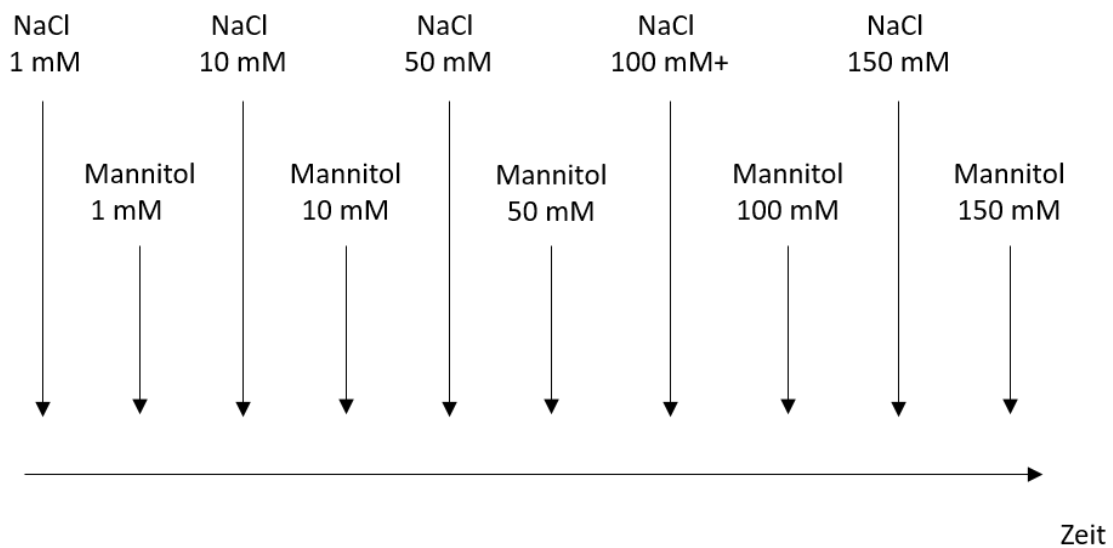


Abbildung 2.1 Schema 1 der Substanzzugabe bei der Calciummessung

Um einen Osmolaritätseffekt zu testen, wurden abwechselnd Mannitol und NaCl zu der Zelle hinzugegeben.

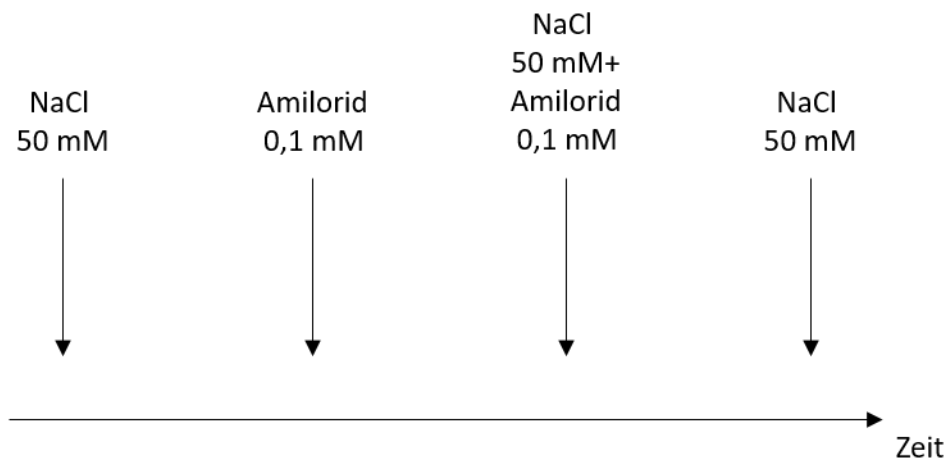


Abbildung 2.2 Schema 2 der Substanzzugabe bei der Calciummessung

Amilorid und auch NaCl zusammen mit Amilorid wurde hinzugegeben, um einen Blockeffekt des ENaC zu testen

2.2.9 Next Generation Sequencing

Nach der Entdeckung, dass es Bürstenzellen auch in der Urethra gibt, wurden sechs einzelnen UBC in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. Dr. Hanns Hatt (Lehrstuhl für Zellphysiologie der Ruhr Universität Bochum durchgeführt von Dr. Paul Scholz und Dr. Sabrina Osterloh) mittels Next Generation Sequencing (NGS) sequenziert. Diese Daten wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit hinsichtlich der Fragestellung analysiert. Natürlich dient das NGS hier wegen der kleinen Gesamtzahl an getesteten Zellen (n=6) keiner systematischen quantitativen Auswertung.

Zur Durchführung des Next Generation Sequencing Experiments wurden isolierte einzelne eGFP-positive Zellen identifiziert, entnommen und in ein PCR Röhrchen übertragen, wobei ein kombiniertes konfokales Laser-Scanning/Patch-Clamp (Leica TCS SP5, Leica Microsystems/Luigs-Neumann, Wetzlar/Ratingen, Deutschland) benutzt wurde. Zell-Lyse, cDNA-Generierung und Amplifikation erfolgten mit dem Sigma SeqPlex RNA Amplifikationskit (Sigma-Aldrich/Merck, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Für die Bibliotheksvorbereitung wurde das Illumina Nextera XT DNA-Proben Probenvorbereitungsprotokoll (Teil # 15031942 Rev. C) verwendet. Die Proben wurden zusammen mit einer Leselänge von 2×75 bp unter Verwendung des dem MiSeq Reagent Kit v3 (150 Zyklen) und dem Illumina MiSeq Desktop Sequencer (Illumina, San Diego, CA, USA) durchgeführt. Die Sequenzierungs-Reads wurden mit dem mm9-Referenz Genom und Transkriptom mit TopHat2 (2.0.9) ausgerichtet. Die TopHat Ausgabedateien wurden im BAM-Format gespeichert und mit Cuffdiff2 (2.1.1) ausgewertet. Alle Proben wurden in einem Berechnungszyklus verglichen und ausgewertet, so dass der Algorithmus die „Fragments Per Kilobase Million“ (FPKM)-Werte auf der Transkriptionsebene schätzen und die Variabilität der Replikatbibliotheken prüfen konnte.

2.2.10 Statistik

Die Daten wurden mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung untersucht. Die Analyse der Mehrfachvergleiche wurde mit dem Kruskal-Wallis-Test und dem anschließenden Dunn-Test für Mehrfachvergleiche durchgeführt. P-Werte $\leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen. Die Analysen wurden mit GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Fettig

3.1.1 Expression von Rezeptoren zur Wahrnehmung von fettigen Stimuli

Zur Untersuchung der Expression von Rezeptoren zur Wahrnehmung von fettigen Stimuli wurden Antikörper gegen GPR120 eingesetzt. Die Immunhistochemie zeigte keine GPR120-positiven Zellen in der Urethra (Abb. 3.1) (n=3). Auch in Schnitten in denen ChAT-positive Zellen sichtbar waren, waren keine GPR120-positiven Zellen vorhanden. Als Positivkontrolle wurde das Duodenum verwendet, da GPR120-positive Zellen hier bereits nachgewiesen wurden (Widmayer et al. 2018). Hier zeigte sich eine gute Markierung der GPR120-positiven Zellen und ChAT positiven Zellen (Abb.3.1).

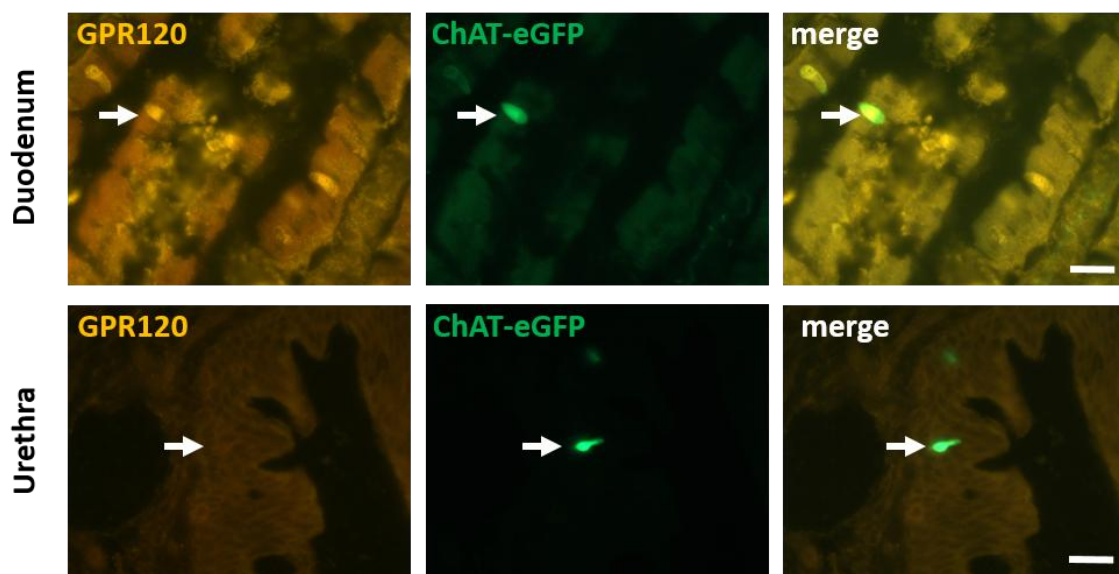


Abbildung 3.1 Immunhistochemie GPR120

Immunhistochemischer Nachweis von GPR120 mittels Antikörper gegen GPR120 in der Positivkontrolle Duodenum (oben) von ChAT-eGFP-Mäusen. Der Pfeil markiert eine Zelle die doppelpositive für ChAT-eGFP und GPR120 ist. In der Urethra wurden zwar ChAT positive Zellen gefunden, aber keine GPR120 positiven Zellen. Der Pfeil markiert eine ChAT positive Zelle. Maßstabsleiste 10 μ m.

3.2 Sauer

3.2.1 Expression von Rezeptoren zur Wahrnehmung von sauren Stimuli

Für den Nachweis von Rezeptoren zur Detektion von sauren Stimuli wurde die Expression des Proteins PKD2L1 untersucht. Es wurde eine Geschmacksknospe der Zunge als Positivkontrolle verwendet, da PKD2L1 hier nachgewiesenermaßen für die Wahrnehmung von sauren Substanzen zuständig ist (Huang et al., 2006). Hierbei konnte in der Immunhistochemie kein Nachweis auf das Vorhandensein dieses Proteins in der Urethra erbracht werden (Abb. 3.2).

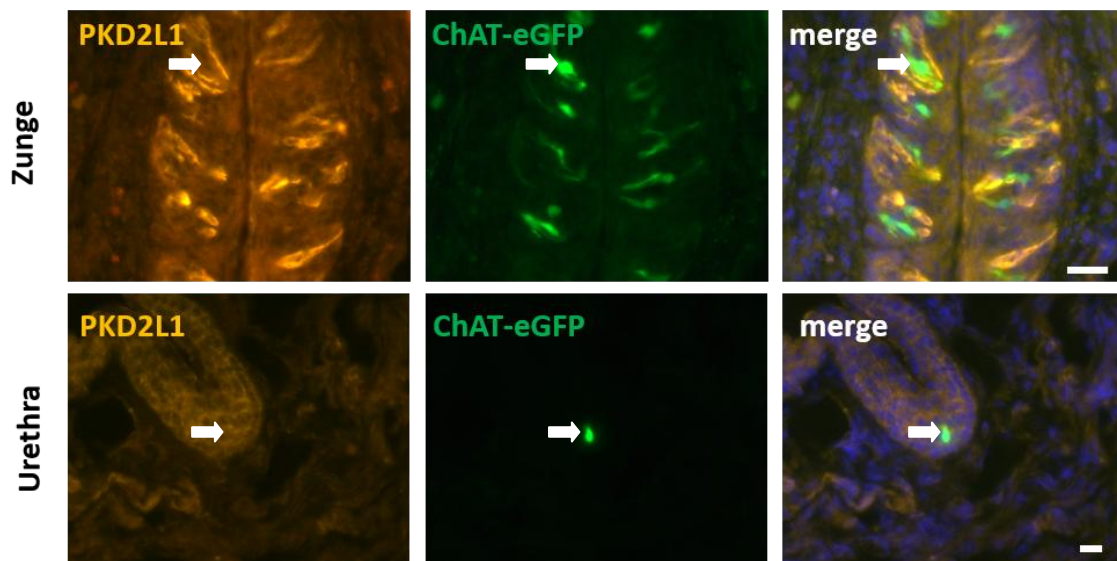


Abbildung 3.2 Immunhistochemie PKD2L1

Immunhistochemischer Nachweis von PKD2L1 mittels Antikörper gegen PKD2L1 in der Positivkontrolle der Geschmacksknospe der Zunge (oben) von ChAT-eGFP-Mäusen (oben). In der Geschmacksknospe sind sowohl PKD2L1 positive als auch ChAT positive Zellen zu sehen. In der Urethra wurden zwar ChAT positive Zellen gefunden, aber keine PKDL2 positiven Zellen. Der Pfeil markiert eine ChAT positive Zelle. Maßstabsleiste 10 μ m.

3.3 Salzig

3.3.1 Expression von ENaC-Untereinheiten in der Urethra und in UBC

Zum Nachweis des zur Salzwahrnehmung benötigten Ionenkanal ENaC wurde die Urethra mittels RT-PCR untersucht. Die Niere wurde als Positivkontrolle verwendet, da bekannt ist, dass der ENaC im distalen Tubulus und im Sammelrohr der Niere exprimiert wird und hier für die Natriumrückresorption und somit für die Regulierung des Wasserhaushaltes zuständig ist (Hanukoglu und Hanukoglu.; 2016). Die RT-PCR zeigte die Expression aller drei Untereinheiten von ENaC (*SCNN1a*, *SCNN1b* und *SCNN1g*) in der Urethra (Abb. 3.3A), sowie in isolierten UBC aus ChAT-eGFP Mäusen sortiert mittels Durchflusszytometrie basierend auf ihrer ChAT-eGFP Expression (Abb. 3.3B).

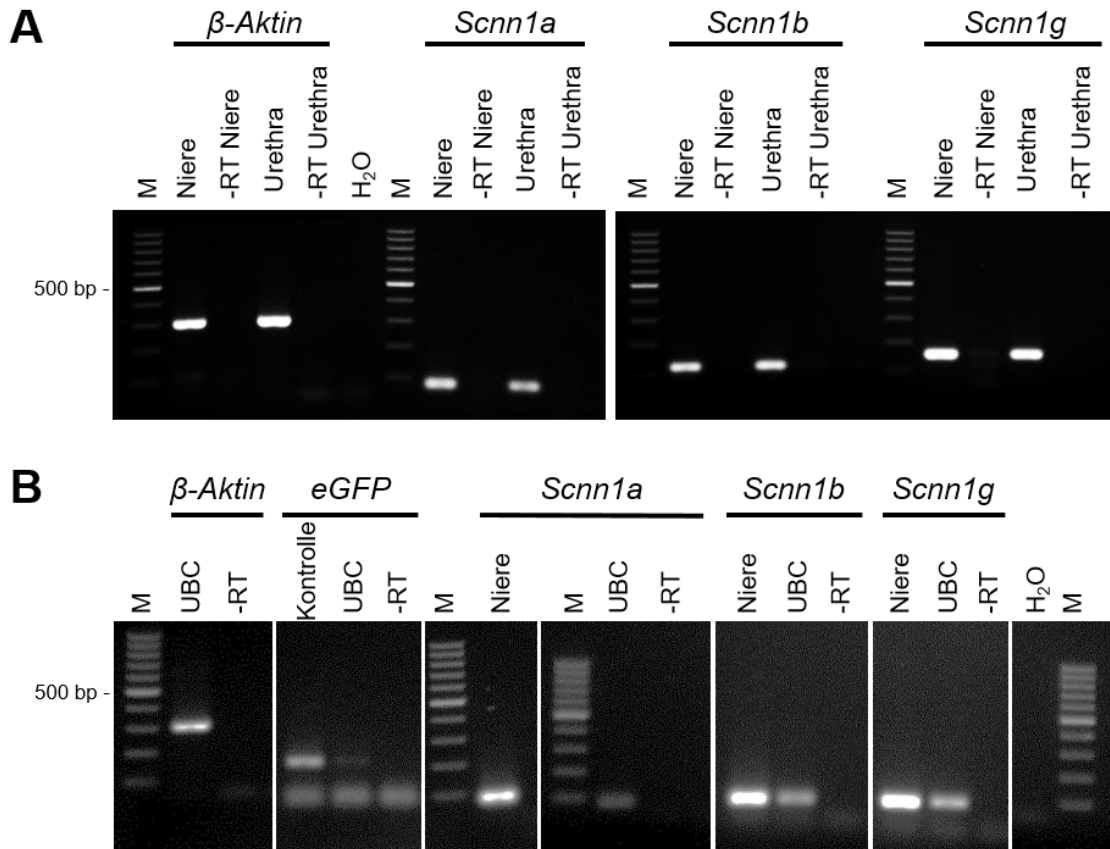


Abbildung 3.3 RT-PCR in Urethra und an isolierten UBC

(A) RT-PCR von Urethra (B) RT-PCR von isolierten UBC. UBC wurden aus ChAT-eGFP Mäusen mittels Durchflusszytometrie basierend auf ihrer ChAT-eGFP Expression isoliert; Die Niere fungierte als Positivkontrolle; Gezeigt ist ein Agarosegel, ENaCα (Scnn1a; 82 bp), ENaCβ (Scnn1b; 115 bp), ENaCγ (Scnn1g; 150), β Aktin (300 bp), eGFP (180 bp); H₂O = Wasserkontrolle (übersetzt und verändert aus Kandel et al. 2018)

3.3.2 Nachweise der ENaC-Untereinheit α in UBC

TRPM5 diente in Scnn1a-tdTomato-Reportermäusen als immunhistochemischer Indikator für UBC. Bei diesen Mäusen konnte eine starke ENaCα-Immunreaktivität in mehreren Zellen des urethralen Epithels nachgewiesen werden. (Abb. 3.4A, B). Hierunter befanden sich auch Deckzellen, welche den luminalen Anteil des Urothels im proximal gelegenen Anteil der Urethra darstellen und durch ihre Lage und Form identifiziert werden können. Dies stimmt überein mit schon beschriebener ENaCα-Immunreaktivität an der luminalen Membran von Deckzellen in der Harnblase von Ratten (Smith et al., 1998) und funktionellen Untersuchungen dieses Zelltyps (McCloskey et al., 2017).

Es fiel auf, dass diese Zellschicht nicht durchgängig tdTomato exprimiert, was darauf hindeuten kann, dass ENaCα-immunreaktive Deckzellen und nicht ENaCα-immunreaktive Deckzellen in einem Mosaikmuster vorhanden sind (Abb. 3.4A). Wenn

man jedoch von einer Heterogenität der Deckzellen ausgeht, welche sich z. B. auch auf die Uroplakin-Expression im menschlichen Ureter bezieht (Riedel et al., 2005), könnte dieses Muster auch Ausdruck für eine inkomplette tdTomato-Markierung in möglicherweise *Scnn1a*-exprimierenden Zellen sein. Um Letzteres zu testen, wurde die tdTomato Expression in der Mucosa der Gallenblase, welche für eine homogene ENaC α Expression bekannt ist (Li et al., 2016), eruiert. In zwei aufgespannten Gallenblasen wurde eine starke tdTomato Markierung in nur 21% der Mucosa bildenden epithelialen Zellen gesehen (Gallenblase 1: 26,8%, Gallenblase 2: 16,0%). 80% der Zellen des Epithels der Gallenblase verblieben ohne Markierung (Abb. 3.4C, D). Diese Häutchenpräparate der Gallenblase wurden ebenfalls mit dem TRPM5-Antikörper inkubiert, um cholinerge chemosensorische Bürstenzellen, welche sich ebenfalls in diesem Epithel befinden (Schütz et al., 2015), zu markieren. Zwei von 59 TRPM5-positiven Zellen exprimierten auch *Scnn1a* (Abb. 3.4C, D). Unter den Zellen, welche sich nicht als Deckzellen darstellten und sich in tieferen Schichten des urethralen Epithels befinden, konnte sowohl eine Kolokalisation von TRPM5-Immunreaktivität und einer *SCNN1a*-tdTomato Markierung beobachtet werden (30 von 46 TRPM5-positiven Zellen, 65%, n=3 Tiere) (Abb. 3.4A, B) als auch TRPM5-positive Zellen ohne *Scnn1a*-tdTomato-Signal (Abb. 3B).

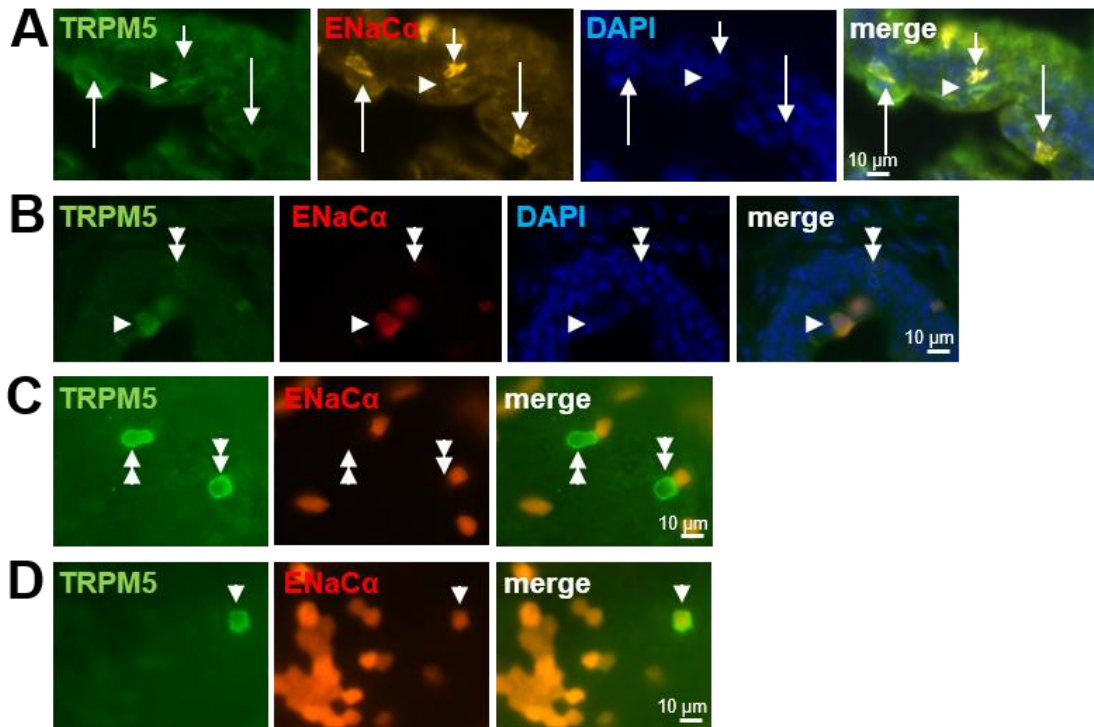


Abbildung 3.4 Nachweis von ENaCα und TRPM5 in der Urethra

UBC exprimieren ENaCα. (A, B) Urethra; Gefrierschnitte: *SCNN1a*/tdTomato (orange oder rot). TRPM5-Immunreaktion (grün) und Zellkerne (DAPI: blau). Mehrere epitheliale Zellen exprimieren nur α-ENaC (Pfeile in A). Zwei davon (lange Pfeile in A) sind urotheliale Deckzellen. (C, D) Gallenblase; aufgespannt: *SCNN1a*/tdTomato (rot) und TRPM5 (grün). (C) zeigt keine Kolokalisation von α-ENaC und TRPM5. (D) Einzelne TRPM5-positive Zellen zeigen eine Kolokalisation von α-ENaC und TRPM5. Pfeilspitzen zeigen auf doppelpositive Zellen mit ENaCα (orange) und TRPM5 (grün). Die doppelten Pfeilspitzen zeigen die TRPM5 positiven Zellen, welche kein ENaCα exprimieren. (Übersetzt und verändert aus Kandel et al. 2018)

3.3.3 $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg als Reaktion auf NaCl

Es konnte gezeigt werden, dass 70% (n=93) der isolierten UBC nach Applikation von NaCl 50 mM mit einem signifikanten Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration reagierten (Abb. 3.5). Dieser Anstieg zeigte sich bei NaCl-Konzentrationen von 50 mM, 100 mM und 150 mM, jedoch nicht bei 1 mM oder 10 mM (Abb. 3.6). Zudem wurde beobachtet, dass der Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ mit steigender NaCl-Konzentration nicht höher ausfiel, sondern dass die maximale Reaktion bei einer NaCl-Konzentration von 50 mM lag (Abb. 3.6).

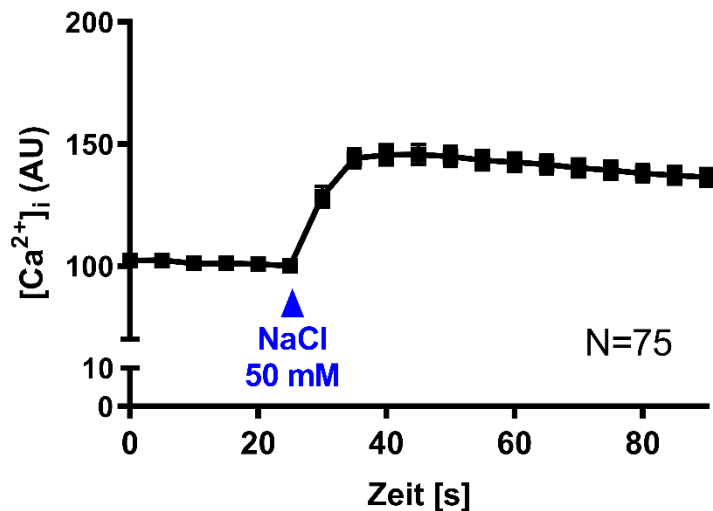


Abbildung 3.5 Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ bei Gabe von 50 mM NaCl

Urethrale Zellen von ChAT-eGFP-Reportermäusen wurden isoliert und UBC anhand der eGFP-Fluoreszenz identifiziert. Die Experimente wurden bei kontinuierlicher Superfusion mit Tyrode-III-Puffer mit 145 mM Na^+ durchgeführt. Die Applikation wurden unter kontinuierlichem Fluss von Tyrode III in die Kammer gegeben, so dass die angegebenen Konzentrationen zunächst erreicht und dann ausgewaschen wurden. Die NaCl-Konzentrationsänderungen ist zusätzlich zur Basislinie der Konzentrationen in Tyrode III angegeben. So lag die Gesamtnatriumkonzentration nach Zugabe von 50 mM im Bereich von 195 mM. Die Y-Achse zeigt die mit konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie aufgezeichnete Calcium Orange®-Fluoreszenz in arbiträren Einheiten (AU), die mit $[Ca^{2+}]_i$ korreliert. Die Gabe von 50 mM NaCl verursacht einen Anstieg von $[Ca^{2+}]_i$; dargestellt sind Mittelwert und SEM. (Übersetzt und verändert aus Kandel et al. 2018)

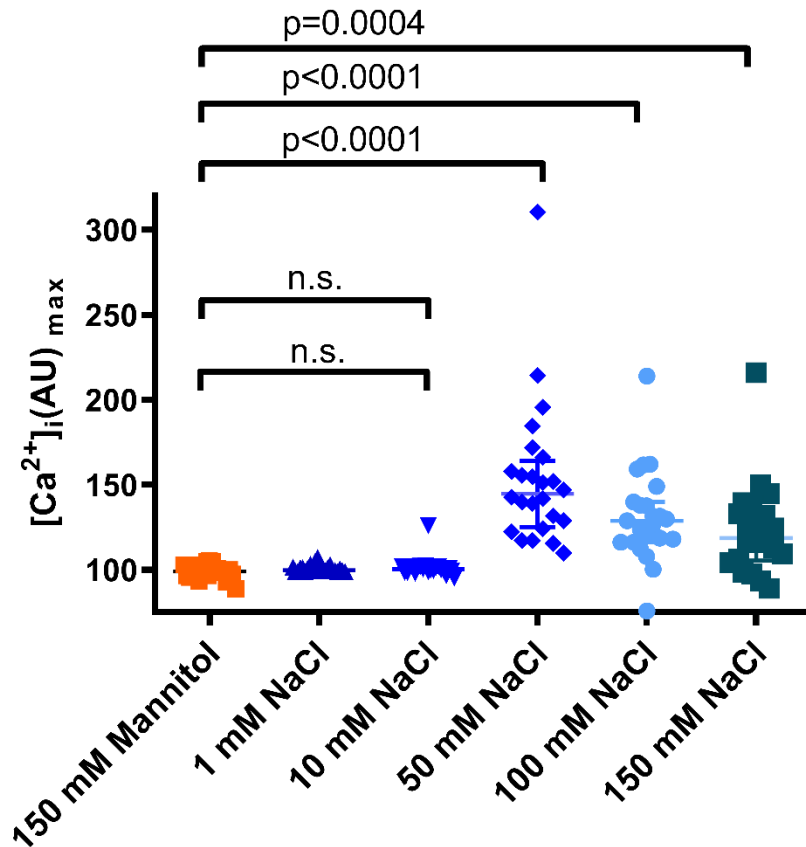


Abbildung 3.6 Intrazelluläre Calcium-Konzentration in UBC nach Gabe von Mannitol und NaCl

$[Ca^{2+}]_i$ -Messung wie beschrieben in Abb. 3.5. Gesamtnatriumkonzentration nach Zugabe von 1-150 mM im Bereich von 146-295 mM. Gezeigt ist der $[Ca^{2+}]_i (AU)_{max}$. Bei NaCl-Konzentrationen von 50 mM, 100 mM und 150 mM. Bei einer NaCl-Konzentration von 1 mM und 10 mM zeigt sich keine Reaktion. Gleiches gilt für 150 mM Mannitol. Dargestellt sind Spitzenwerte Werte nach Stimulation mit Mannitol (150 mM, n=22) und NaCl (1 mM, n=22; 10 mM, n=22; 50 mM, n=24; 100 mM, n=23; 150 mM, n=21) mit Median und Interquartilsbereich; p Werte im Vergleich zu Mannitol 150 mM, Kruskal-Wallis-Test gefolgt von Dunn's Multiple Comparison Test. (Übersetzt und verändert aus Kandel et al. 2018)

3.3.4 Reaktion der $[Ca^{2+}]_i$ auf NaCl im Vergleich mit Mannitol

Mannitol wurde verwendet, um einen osmotischen Effekt, der ebenfalls zu einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ führen könnte, zu prüfen. Hierfür wurden verschiedene Konzentrationen von Mannitol verwendet. Da Mannitol selbst bei 150 mM keine stimulierende Wirkung auf $[Ca^{2+}]_i$ hatte, ist die beobachtete Reaktion von UBC auf 50 mM NaCl, die zur weiteren Charakterisierung der Polymodalität verwendet wurden, kein Osmolaritätseffekt (Abb.3.6 und 3.7).

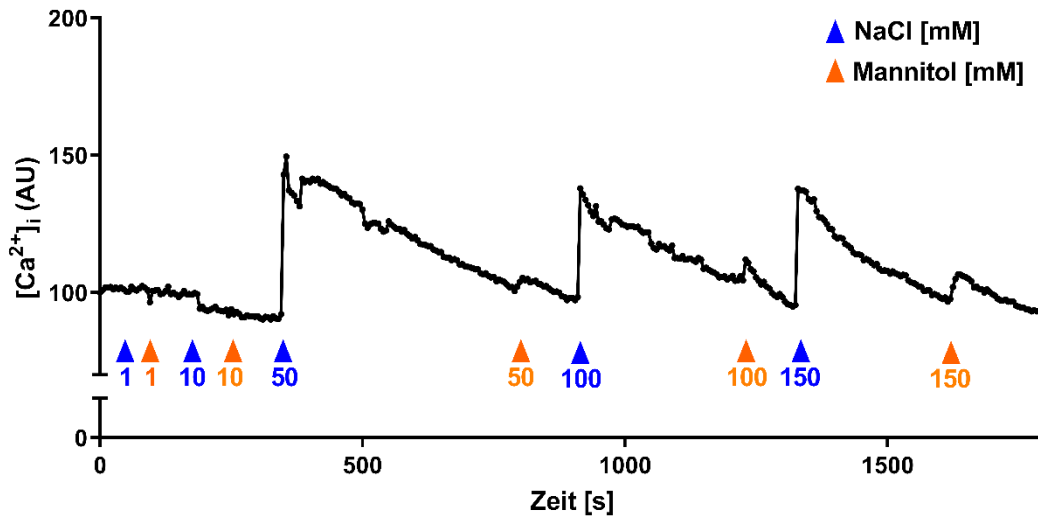


Abbildung 3.7 Intrazelluläre Calcium-Konzentration in einer UBC als Antwort auf NaCl und Mannitol

$[Ca^{2+}]_i$ -Messung wie beschrieben in Abb. 3.5. Gesamtnatriumkonzentration nach Zugabe von 1-150 mM im Bereich von 146-295 mM. Gezeigt ist eine repräsentative Messung einer einzelnen UBC. Es zeigt sich jeweils ein Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration bei Zugabe von NaCl in den Konzentration 50 mM, 100 mM und 150 mM. Bei Zugabe von Mannitol mit der gleichen Molarität zeigt sich jeweils nur eine minimale Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration. Hierbei muss jedoch beachtet werden, dass 100 mM Mannitol die gleiche Wertigkeit hat wie 50 mM NaCl. Im Vergleich kann trotzdem ein Osmolaritätseffekt ausgeschlossen werden. Diese Applikationsfolge wurde mehrfach durchgeführt (n=3). (Übersetzt und verändert aus Kandel et al. 2018)

3.3.5 Blockade des ENaC durch Amilorid

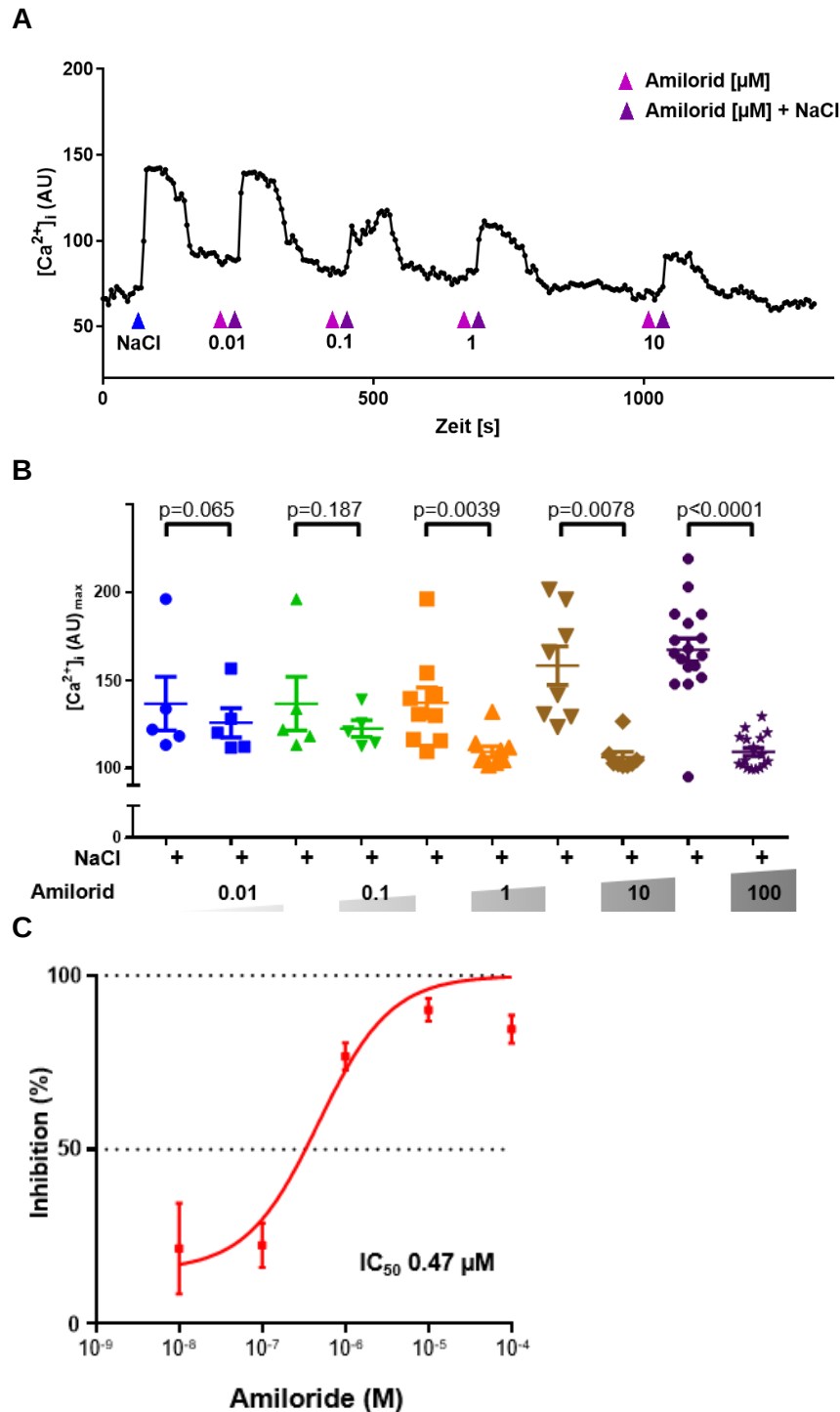


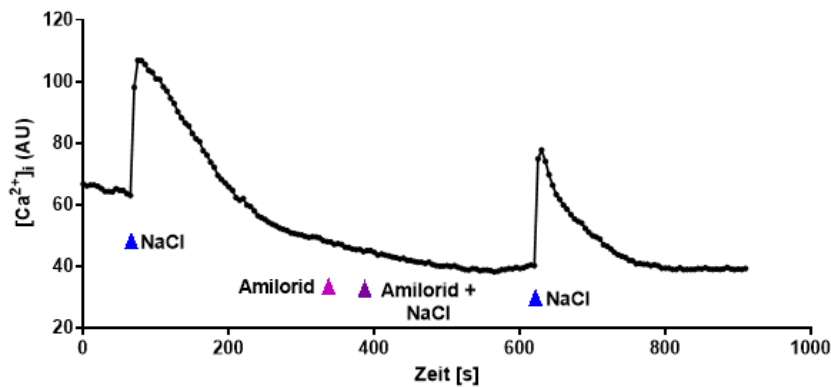
Abbildung 3.8 Inhibition der NaCl-Antwort in UBC durch Amilorid

$[Ca^{2+}]_i$ -Messung wie beschrieben in Abb. 3.5. (A) Repräsentative Messung einer UBC als Reaktion auf NaCl (50 mM) in Abwesenheit und Anwesenheit steigender Konzentrationen von Amilorid (0,01-10 μ M). (B) Dargestellt sind die $[Ca^{2+}]_i$ (AU)_{max} nach Applikation von NaCl (50 mM) in Abwesenheit und Anwesenheit steigender Konzentrationen von Amilorid (0,01 μ M, n=5; 0,1 μ M, n=5; 1 μ M, n=9; 10 μ M, n=8; 100 μ M, n=17), p-Werte wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test berechnet und sind in der Abbildung angegeben. (C) Dosis-Wirkungskurve von Amilorid in UBC; IC₅₀ = 0,47 μ M. (Übersetzt und verändert aus Kandel et al. 2018)

Amilorid ist ein ENaC-Inhibitor, der bekanntermaßen die Wahrnehmung salziger Stimuli in Typ I-Geschmackszellen unterdrückt (Vandenbeuch et al., 2008). In Calciummessungen konnte beobachtet werden, dass die Reaktion der UBC auf 50 mM NaCl durch die gleichzeitige Anwesenheit von Amilorid konzentrationsabhängig (0,01-100 μ M) unterdrückt werden konnte. Dies galt sowohl bei sequenzieller (Abb. 3.8A) als auch bei unabhängiger (Abb. 3.8B) Gabe der Stimuli. Amilorid blockiert den Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ auf 50 mM NaCl in UBC mit einem IC_{50} von 0,47 μ M (Abb. 3.8C).

Auch bei einer Amilorid-Höchstkonzentration von 100 μ M war der Block-Effekt nach Waschen nach 200 Sekunden reversibel. Daraus ergibt sich, dass der in den UBC beobachtete $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg amilorid-sensibel ist. In Abbildung 3.8 ist zu sehen, dass die Reaktion auf 50 mM NaCl zunächst wie oben berichtet stattfindet. Nach Gabe von Amilorid alleine bzw. Amilorid in Kombination mit NaCl kam es zu keinem Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration. Nachdem allerdings das Amilorid, und somit der NaCl-Block ausgespült wurde, wurde erneut ein signifikanter Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ auf NaCl-Gabe beobachtet (Abb. 3.9).

A



B

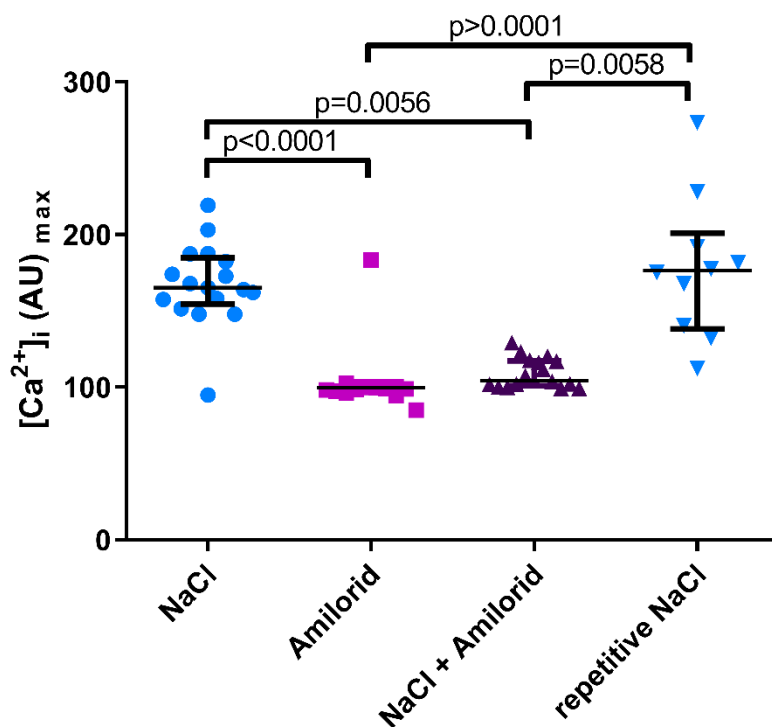


Abbildung 3.9 Intrazelluläre $[Ca^{2+}]_i$ Reaktion auf NaCl, Amilorid und NaCl+Amilorid

$[Ca^{2+}]_i$ -Messung wie beschrieben in Abb. 3.5 (A) Repräsentative Messung einer UBC als Reaktion auf NaCl (50 mM) in Abwesenheit und Anwesenheit von Amilorid. (0,1 mM); (B) Dargestellt sind die die $[Ca^{2+}]_i$ (AU)_{max} nach Anwendung von NaCl (50 mM, n=17), Amilorid (0.1 mM, n=17), NaCl (50 mM) zusammen mit Amilorid (0,1 mM, n=17) und wiederholtem NaCl (50 mM, n=10); Kruskal-Wallis-Test, gefolgt von Dunns Mehrfachvergleichstest. Gezeigt ist der Median und Interquartilsbereich. (Übersetzt und verändert aus Kandel et al. 2018)

3.4 Polymodalität der UBC

Um polymodale Eigenschaften der UBC zu testen, wurden UBC zum einen mit NaCl und ATP (n=90; 70% reagierten auf NaCl) bzw. mit NaCl und Denatonium und zum anderen allen drei Stimuli ausgesetzt (n=37; 67% reagierten auf NaCl, Abb. 3.10). Die Stimulation mit ATP und NaCl zeigte, dass 70% der Zellen auf NaCl reagierten (n=90). Die Stimulation mit Denatonium und NaCl zeigte, dass 67% der Zellen auf NaCl reagierten (n=36). Hierbei traten alle drei möglichen Reaktionsmuster in einer annähernd ausgeglichenen Verteilung auf: 42% reagierten nur auf NaCl, 33% reagierten nur auf Denatonium und 25% reagierten auf beide Stimuli. Bei der Stimulation von UBC (n=37) mit allen drei Stimuli (ATP, Denatonium und NaCl) konnten alle möglichen Reaktionsvarianten in unterschiedlicher Ausprägung beobachtet werden: Nur NaCl 16%, nur Denatonium 3%, nur ATP 3%, NaCl und Denatonium 3%, Denatonium und ATP 30%, NaCl und ATP 24% und NaCl, Denatonium und ATP 22%. Insgesamt reagierten 67% auf NaCl. Diese Verteilungsmuster von etwa 60-70% der UBC reagieren auf NaCl spiegelt sich auch in etwa in der Immunhistochemie (64% der UBC exprimieren das Scnn1a-tdTomato-Signal) wider.

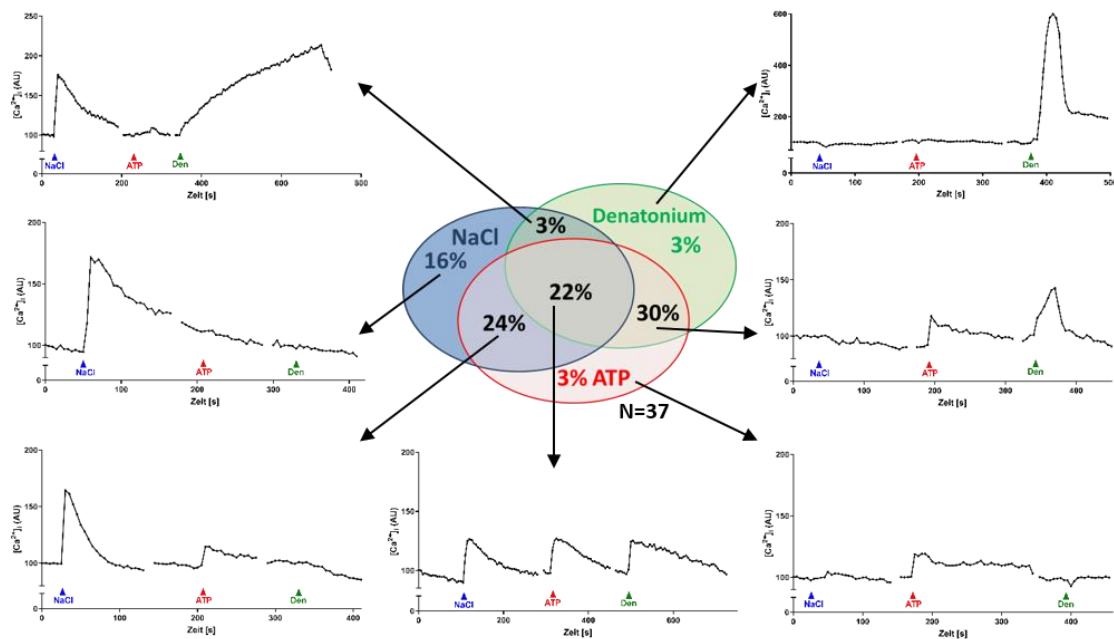


Abbildung 3.10 Reaktionen der UBC auf NaCl, Denatonium und ATP

UBC reagieren auf NaCl, ATP und Denatonium. Abgebildet wird die sequentielle Stimulation mit NaCl (50 mM zu der Grundkonzentration im Tyrode-Puffer), ATP (0,5 mM) und Denatonium (25 mM). Die Reihenfolge der Stimuli wurde zwischen den Experimenten gewechselt ($n=37$). Die Abbildung zeigt repräsentative Aufnahmen der Änderung der Calcium Orange®-Fluoreszenz in einzelnen cholinergen ($eGFP^+$) UBC. Die Experimente erfolgten unter kontinuierlicher Perfusion mit Tyrode III-Puffer und die verschiedenen Stimuli wurden darunter hinzugefügt, sodass die angegebenen Konzentrationen zunächst erreicht und anschließend ausgewaschen wurden. Die Y-Achse gibt die Calcium Orange® Fluoreszenz in Arbitrary Units (AU, willkürliche Einheit) an. (Übersetzt und verändert aus Kandel et al. 2018)

3.5 Next Generation Sequencing

Im NGS der sechs isolierten $eGFP$ -positiven urethralen Zellen konnte gezeigt werden, dass *Scnn1a* in vier von sechs Zellen vorhanden ist (66,7%). *Scnn1b* und *Scnn1g* hingegen waren nur in einer von sechs Zellen nachweisbar. Wie schon in der Einleitung erwähnt, kann der Ionenkanal ENaC auch funktionieren, wenn nur die α -Untereinheit, die durch *Scnn1a* kodiert wird, vorhanden ist (Canessa et al., 1994). Zudem zeigten 2 der 6 Zellen (33%) zusätzlich einen Rezeptor für Denatonium, wie z. B. Tas2r108 (Abb. 3.11).

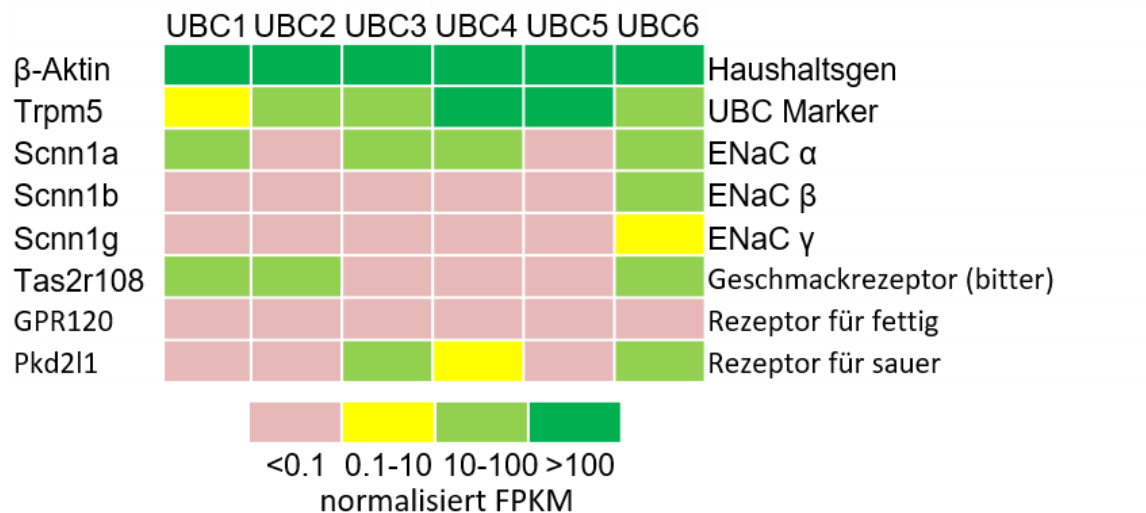


Abbildung 3.11 Expression der die ENaC Untereinheiten kodierenden Gene in einzelnen UBC, bestimmt durch Next Generation Sequencing.

Die Abbildung zeigt das Detektionslevel als normalisierte FPKM in GFP-positiven UBC aus Chat-eGFP Mäusen. FPKM = Fragment per Kilobase Million.

Dieses Ergebnis deckt sich, zumindest was die α-Untereinheit angeht, mit den zuvor beschriebenen Ergebnissen der RT-PCR und aus der Immunhistochemie, sodass eine Subpopulation der UBC sehr wahrscheinlich die α-ENaC-Untereinheit exprimiert. Interessanterweise decken sich die Ergebnisse auch mit den Immunhistochemischen Ergebnissen zur Expression von GPR120. Einzig die Expression von PKD2L1 ist in NSG höher als sie in der Immunhistochemie nachgewiesen wurde.

4. Diskussion

4.1 Sauer und fettig

Obwohl die Expression der untersuchten Rezeptoren, welche saure und fettige Stimuli wahrnehmen, nicht nachgewiesen werden konnte, bedeutet dies nicht, dass die Wahrnehmung nicht gegeben ist. Es gibt viele weitere Rezeptoren wie z. B. säure sensitive Ionen Kanäle (acid sensitive ion channels, ASICs), Kaliumkanäle der Subgruppe K (potassium two-pore domain channel subfamily K, KCNK) oder Otopetrin (Zhang et al., 2019), welche in dieser Arbeit nicht getestet wurden. Bei sauren Stimuli kann man vermuten, dass die Zelle mit einem Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration durch Einstrom in die Zelle reagiert, da dies auch in den Typ III Zellen in den Geschmacksknospen der Fall ist. Auf fettige Stimuli folgt am ehesten eine Signaltransduktionskaskade wie bei der Wahrnehmung von Stimuli mit den Qualitäten umami, bitter, süß, d.h. über eine Aktivierung von TRPM5 und einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration durch Ausstrom aus dem ER (Rosario et al., 2022). Dass Bürstenzellen in anderen Organen als der Urethra auf fettige (Arora et al., 2021) Stimuli reagieren und teilweise eine Immunantwort hervorrufen, ist bereits nachgewiesen, sodass ein Vorkommen in den UBC nicht komplett auszuschließen ist.

4.2 Ist ENaC in UBC vorhanden?

Es konnte nachgewiesen werden, dass UBC mit einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration reagieren, wenn 50 mM NaCl hinzugegeben werden, und dass dieser Effekt durch Amilorid blockierbar ist.

Dies allerdings bedeutet nicht zwangsläufig, dass der ENaC mit seinen drei Untereinheiten für diese Reaktion zuständig ist, weil er in anderen Organen, wie z. B. den Geschmacksknospen der Mäuse, genauer den Papillae fungiformes, auch schon geringere Konzentrationen an NaCl wahrnimmt (Chandrashekar et al., 2010). Zudem zeigte nur eine von sechs UBC alle drei Untereinheiten im NGS. Weiterhin scheint die Aktivität des ENaC in Mäusen bei 60 mM NaCl im extrazellulären Medium maximal zu sein (Sheng et al., 2004), was unter der Konzentration liegt, die in diesen Versuchen verwendet wurde (>50 mM NaCl zusätzlich zum Tyrode III-Puffer; Gesamtkonzentration 146-295 mM). Die Reaktion auf den Stimulus NaCl war sensitiv auf Amilorid, wohingegen die Basiskonzentration des intrazellulären Calciums in UBC es nicht war, obwohl 145 mM NaCl im Tyrode III-Puffer vorhanden war. Letztlich lag der IC_{50} für die beobachtete Inhibition des Calciumsignals durch Amilorid, trotz der Tatsache, dass der Calciumspiegel in der Zelle gemessen wurde und dies nicht direkt eine ENaC-Aktivität misst, über dem der Inhibition von ENaC (0,1 μ M) (Ahn et al., 1999). Dies könnte auf einen alternativen amilorid-sensitiven Ionenkanal hindeuten, der

auch die α -Untereinheit des ENaC besitzt. Es wurde bereits gezeigt, dass die α -Untereinheit auch in anderen Ionenkanälen, wie z. B. dem „acid sensing ion channel 1“, vorhanden ist (Jeggle et al., 2015), der einen nicht-selektiven Ionenkanal darstellt (Trac et al., 2017). Die Expression von säureregistrierenden Ionenkanälen in UBC war jedoch nicht konsequent und sehr niedrig. Alternativ kann die α -Untereinheit des ENaC in vitro homomere Ionenkanäle bilden (Canessa et al., 1994), was jedoch noch in vivo nachgewiesen werden muss.

Unabhängig von der molekularen Zusammensetzung eines amilorid-sensitiven salzdurchlässigen Kanals in UBC, können hohe NaCl-Konzentrationen zu einer Depolarisation der Membran führen, was einen Calciumeinstrom in die Zelle durch spannungsabhängige Calciumkanäle und so eine ACh-Freisetzung bedingen könnte. Im NGS zeigte sich, dass UBC die α -Untereinheiten der spannungsabhängigen Calciumkanäle $Ca_v1.2$ (*Cacna1d*), $Ca_v1.3$ (*Cacna1d*) und $Ca_v2.3$ (*Cacnac1e*) enthalten. Zudem konnte in fünf von sechs Zellen die $\beta 4$ -Untereinheit des ENaC nachgewiesen werden. Die β -Untereinheiten sind generell für die Membranlokalisation zuständig. Die $\beta 4$ -Untereinheit scheint hierbei die subzelluläre Membranlokalisation zu bestimmen (Campiglio and Flucher, 2015). Diese spannungsabhängigen Calciumkanäle können im Zusammenspiel mit der durch NaCl hervorgerufenen Membrandepolarisation zu einer ACh-Freisetzung der UBC führen.

4.3 Physiologischer Nutzen der Erkennung von salzigen Stimuli

Das physiologische Nutzen der Erkennung von salzigen Stimuli von den UBC bleibt unklar. Bei ausgewachsenen C57BL/6J-Mäusen liegt die NaCl-Konzentration im Urin bei ca. 150 mM, was ungefähr der des verwendeten Tyrode-Puffers entspricht (145 mM). Die NaCl-Konzentration des Urins kann aber variieren, je nachdem wie hoch die Salzeinnahme und/oder die Flüssigkeitsaufnahme ist (Li et al., 2012). Während dieser Situationen können cholinerge UBC Salzkonzentrationen ausgesetzt sein, die denen in dieser Arbeit verwendeten ähneln. UBC im Allgemeinen sind als „Wächter“ des unteren harnableitenden Systems zu verstehen, da sie dafür ausgestattet sind, potentiell schädliche Stoffe, vor allem bakterielle Produkte, an der Zelloberfläche zu detektieren (Deckmann et al., 2014; Deckmann and Kummer, 2016; Kummer and Deckmann, 2017). Bakterielle Infektionen gehen jedoch normalerweise nicht mit einer erhöhten Salzkonzentration des Urins einher. Dennoch könnte α -ENaC eine andere Funktion haben, als die luminale NaCl-Konzentration zu überwachen. ENaC ist in vielen Organen hauptsächlich für den Erhalt der Elektrolyt- und Wasserhomöostase zuständig, wie z. B. die Konzentrierung des Urins in der Niere (Kellenberger and Schild, 2002). Wenn man die geringe Anzahl der cholinergen UBC in der Urethra und

deren minimalen Berührungspunkt mit dem Lumen bedenkt, scheint diese Funktion jedoch eher unwahrscheinlich. Jedoch ist ENaC auch ein mechanosensitiver Ionenkanal, welcher auf mechanischen Stress reagiert (Althaus et al., 2007; Guo et al., 2016). Dies eröffnet die Möglichkeit, dass UBC, welche ENaC-Untereinheiten besitzen, daran beteiligt sind, den Urinfluss in der Urethra wahrzunehmen. Ein mechanischer Reiz erreicht nicht nur die luminale Membran, sondern kann auch die UBC erreichen, welche keine eindeutige Verbindung zum Lumen haben ("closed type"; Deckmann and Kummer, 2016).

UBC sind mit sensorischen Nerven verbunden und initiieren reflektorisch eine Miktion, wenn die Bittersubstanz Denatonium im urethralen Lumen eingebracht wird (Deckman et al., 2014). Auch auf süße Substanzen wurde eine solche reaktive Miktion Tas1R3 abhängig und unabhängig nachgewiesen (Schmidt et al., 2024). Dies ist bereits zuvor als protektiver Reflex interpretiert worden, da hierdurch mögliche schädliche Stoffe "herausgespült" werden (Deckmann et al., 2014; Kummer and Deckmann, 2017). Die entleerende Wirkung wird ausgeweitet durch ein sensorisches Feedback der Urethra, in der Sensoren, die Fluss wahrnehmen, physiologisch charakterisiert, jedoch noch nicht anatomisch definiert sind (Todd, 1964; Peng et al., 2008; Danziger and Grill, 2015). Folglich könnte eine Mechanosensitivität von cholinergen UBC dazu dienen, den Erfolg des Reflexes, den sie initiiert haben, zu registrieren.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde sich mit Bürstenzellen beschäftigt, welche bereits in verschiedenen Organen von Mäusen nachgewiesen wurden. Bei Bürstenzellen handelt es sich um extraorale chemosensorische Zellen, welche ähnlich wie Geschmackszellen, eine Geschmackssignaltransduktionskaskade beinhalten. Das bedeutet, dass die Aktivierung eines Geschmackrezeptors, wie α -Gustducin, PLC β 2 oder TRPM5 zu einem Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration führt, was wiederum eine Ausschüttung von Acetylcholin zur Folge hat.

Hier wurden speziell die urethralen Bürstenzellen (UBC) und die Wahrnehmung derer auf verschiedene Stimuli betrachtet. Es wurde bereits gezeigt, dass eine bedeutende Anzahl an UBC, welche auf Denatonium reagieren, auch auf Glutamat reagieren (Deckmann et al., 2014). Im Zusammenhang mit oropharyngealer Geschmackswahrnehmung spiegeln diese Substanzen einen aversiven (Denatonium: bitter) und einen "attraktiven" (Glutamat: umami) Stimulus wider und werden durch unterschiedliche Zellpopulationen wahrgenommen, welche als Subtypen der Typ II Geschmackszellen angesehen werden können (Chaudhari and Roper, 2010).

Methodisch wurden die UBC isoliert und auf verschiedene Arten verarbeitet, um nachzuweisen, ob Rezeptoren zur Wahrnehmung von sauren (PKD2L1, PDK1L3), fettigen (CD36, GPR120, GPR40) und salzigen Stimuli (ENaC) enthalten sind. Zum einen wurde durch Immunfluoreszenz nachgewiesen, dass o. g. Rezeptoren für saure und fettige Stimuli weder in der Urethra noch in UBC vertreten sind. Zum anderen konnte mittels PCR nachgewiesen werden, dass jedoch die α -Untereinheit des ENaC-Kanals in den UBC vorkommen. Weiterhin wurde, nach Isolation der UBC, unter einem CLSM (Konfokales Laser Scanning Mikroskop) gezeigt, dass die Zellen nach Zugabe von NaCl mit einer Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration reagieren. Dass es sich hierbei um einen osmotischen Effekt handelt, wurde durch die Zugabe einer vergleichbaren Konzentration an Mannitol und ausbleibender intrazellulärer Calciumerhöhung nachgewiesen. Amilorid als bekannter Hemmer des ENaCs führte bei simultaner NaCl Gabe ebenfalls zu einem Ausbleiben einer Reaktion der Zelle.

Die mit dieser Arbeit erhobenen Daten zeigen, dass es eine noch größere Vielfaltigkeit an Subtypen der UBC gibt, bei denen einige auch Funktionen und Merkmale der Typ I Geschmackszellen beinhalten, ENaC (epithelialer Natriumkanal) exprimieren und somit auf NaCl (Natriumchlorid) in Form einer Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration reagieren können (Vandenbeuch et al., 2008).

Die Untersuchungen untermauern zudem die Vermutung des polymodalen Charakters von UBC. Die multiplen Kombinationen an Reaktionen auf verschiedene chemosensorische Stimuli und die Expression verschiedener Gene, welche für unterschiedliche Signalkaskaden verantwortlich sind, sind eher als phänotypische Variation einer polymodalen chemosensorischen Zelle, anstelle von verschiedenen, klar zu unterscheidenden Zelltypen zu interpretieren.

6. Summary

In this thesis brush cells, which already were proven in different mouse organs, were examined. Brush cells are extraoral chemosensory cells, which, like taste cells, contain a taste signal transduction cascade. That means, that by activating a taste receptor like α -Gustducin, PLC β 2 or TRPM5 the intracellular calcium concentration increases, which again leads to a release of ACh.

Here the focus was on urethral brush cells (UBC) and their reception of different stimuli. It was previously shown that a substantial number of denatonium-responsive UBC also reacts to monosodium glutamate (Deckmann et al., 2014). In terms of oropharyngeal gustation, these substances reflect an aversive (denatonium: bitter) and an attractive (monosodium glutamate: umami) stimulus, and, accordingly, are perceived by distinct cell populations, which still are considered as subtypes of type II taste cells (Chaudhari and Roper, 2010).

The UBC were isolated and processed in different ways to check if receptors for sour (PKD2L1, PDK1L3), fatty (CD36, GPR120, GPR40) or salty (ENaC) stimuli are present. On the one hand it was shown via immunofluorescence that above mentioned receptors for fatty and sour stimuli are neither apparent in the urethra nor in UBC. On the other hand, the α -subunit of the ENaC was proven to exist in UBC via PCR. Furthermore, it was shown that, after isolating UBC and examining their reaction with a CLSM (confocal laser scanning microscope), the UBC reacted with an increase of intracellular calcium by adding NaCl. An osmotic effect was ruled out by adding similar concentrations of mannitol to which there was no increase of the intracellular calcium concentration. Amiloride as a known ENaC inhibitor also led to no reaction of the UBC when given simultaneously with NaCl.

The present data show an even broader diversity of UBC properties in that some of them share features also with type I cells of taste buds, expressing ENaC (epithelial sodium channel) and being responsive to NaCl (Natriumchloride) (Vandenbeuch et al., 2008). These findings further substantiate the polymodal character of cholinergic UBC.

As far as further distinctive criteria are missing, we interpret the multiple combinations of responsiveness to various chemosensory stimuli and gene expression of related signaling components as phenotypic variation of a broadly tuned, polymodal chemosensory cell rather than defining multiple, clearly separated cell types.

7. Abkürzungsverzeichnis

ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterase
ATP	Adenosintriphosphat
ASICs	acid sensitive ion channels
$[Ca^{2+}]_i$	Intrazelluläre Calcium-Konzentration
CarAT	Carnitin Acetyltransferase
ChAT	Cholinacetyltransferase
CLSM	Konfokales laser scanning Mikroskop
DMSO	Dimethylsulfoxid
eGFP	enhanced green fluorescent protein
ENaC	Epithelial sodium channel = epithelialer Natriumkanal
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FPKM	Fragment per Kilobase Million
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
HBSS	Hanks' balanced salt solution
KCNK	potassium two-pore domain channel subfamily K
LCFA	longchain fatty acids = langkettige Fettsäuren
mAChR	muskarinerger Acetylcholinrezeptor
nAChR	nikotinerger Acetylcholinrezeptor
NaCl	Natriumchlorid
NGS	Next Generation Sequencing
PBS	Phosphat buffered saline
PFA	Paraformaldehyd
PP	Phosphatpuffer
TRPM5	transient receptor potential cation channel subfamily M member 5
UTC	urethral tuft cells = urethrale Bürstenzellen
UBC	Urethral brush cell = urethrale Bürstenzelle
UCCC	urethral cholinergic chemosensory cells = urethrale cholinerge chemosensorische Zellen

8. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

a. Tabellen

Tabelle 2.2 Liste der verwendeten Primärantikörper.....	11
Tabelle 2.3 Liste der verwendeten Sekundärantikörper	11
Tabelle 2.4 Liste der verwendeten Oligonukleotide für die qualitative RT-PCR	12
Tabelle 2.5 Verwendete Filter für das Fluoreszenzmikroskop.....	17
Tabelle 2.6 Am CLSM verwendete Anregungswellenlängen	20

b. Abbildungen

Abbildung 1.1 Ableitende Harnwege.....	1
Abbildung 1.2 Menschliche Urethra.....	3
Abbildung 1.3 Murine Urethra.....	4
Abbildung 1.4 Geschmacksknospe.....	5
Abbildung 1.5 Gustatorische Geschmackskaskade	6
Abbildung 2.1 Schema 1 der Substanzzugabe bei der Calciummessung	21
Abbildung 2.2 Schema 2 der Substanzzugabe bei der Calciummessung	21
Abbildung 3.1 Immunhistochemie GPR120	23
Abbildung 3.2 Immunhistochemie PKD2L1.....	24
Abbildung 3.3 RT-PCR in Urethra und an isolierten UBC	25
Abbildung 3.4 Nachweis von ENaC α und TRPM5 in der Urethra.....	27
Abbildung 3.5 Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ bei Gabe von 50 mM NaCl	28
Abbildung 3.6 Intrazelluläre Calcium-Konzentration in UBC nach Gabe von Mannitol und NaCl.	29
Abbildung 3.7 Intrazelluläre Calcium-Konzentration in einer UBC als Antwort auf NaCl und Mannitol.....	30
Abbildung 3.8 Inhibition der NaCl-Antwort in UBC durch Amilorid	31
Abbildung 3.9 Intrazelluläre $[Ca^{2+}]_i$ Reaktion auf NaCl, Amilorid und NaCl+Amilorid...	33
Abbildung 3.10 Reaktionen der UBC auf NaCl, Denatonium und ATP.....	35
Abbildung 3.11 Expression der die ENaC Untereinheiten kodierenden Gene in einzelnen UBC, bestimmt durch Next Generation Sequencing.	36

9. Literaturverzeichnis

Ahn, Y. J., Brooker, D. R., Kosari, F., Harte, B. J., Li, J., Mackler, S. A., et al. (1999). Cloning and functional expression of the mouse epithelial sodium channel. *Am. J. Physiol.* 277, F121–F129. doi: 10.1152/ajprenal.1999.277.1.F121

Althaus, M., Bogdan, R., Clauss, W. G., and Fronius, M. (2007). Mechano-sensitivity of epithelial sodium channels (ENaCs): laminar shear stress increases ion channel open probability. *FASEB J.* 21, 2389–2399. doi: 10.1096/fj.06-7694

Avenet, P., and Lindemann, B. (1988). Amiloride-blockable sodium currents in isolated taste receptor cells. *J. Membr. Biol.* 105, 245–255. doi: 10.1007/BF01871001

Arora P., [†] Andersen D., [†] Moll JM, [†] Danneskiold-Samsøe NB, Xu L., Zhou B., Kladis G., Rausch P., Workman CT, Kristiansen K., Brix S. (2021) Small Intestinal Tuft Cell Activity Associates With Energy Metabolism in Diet-Induced Obesity, *Front. Immunol.*, 12: 629391. doi.org/10.3389/fimmu.2021.629391

Baines, D. (2013). Kinases as targets for ENaC regulation. *Curr. Mol. Pharmacol.* 6, 50–64. doi: 10.2174/18744672112059990028

Birder, L., and Andersson, K. E. (2013). Urothelial signaling. *Physiol. Rev.* 93, 653–680. doi: 10.1152/physrev.00030.2012

Birder, L., De Groat, W., Mills, I., Morrison, J., Thor, K., and Drake, M. (2010). Neural control of the lower urinary tract: peripheral and spinal mechanisms. *Neurourol. Urodyn.* 29, 128–139. doi: 10.1002/nau.20837

Bommas-Ebert U., Teubner P., Voß R. (2011) Kurzlehrbuch Anatomie, *Thieme Verlag*

Campiglio, M., and Flucher, B. E. (2015). The role of auxiliary subunits for the functional diversity of voltage-gated calcium channels. *J. Cell. Physiol.* 230, 2019–2031. doi: 10.1002/jcp.24998

Canessa, C. M., Schild, L., Buell, G., Thorens, B., Gautschi, I., Horisberger, J. D., et al. (1994). Amiloride-sensitive epithelial Na⁺ channel is made of three homologous subunits. *Nature* 367, 463–467.

Carattino, M. D., Sheng, S., and Kleyman, T. R. (2005). Mutations in the pore region modify epithelial sodium channel gating by shear stress. *J. Biol. Chem.* 280, 4393–4401. doi: 10.1074/jbc.M413123200

Cartoni C¹, Yasumatsu K, Ohkuri T, Shigemura N, Yoshida R, Godinot N, le Coutre J, Ninomiya Y, Damak (2010) Taste preference for fatty acids is mediated by GPR40 and GPR120, *J Neurosci.*;30(25):8376-82. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0496-10.2010

Chandrashekar, J., Kuhn, C., Oka, Y., Yarmolinsky, D. A., Hummler, E., Ryba, N. J., et al. (2010). The cells and peripheral representation of sodium taste in mice. *Nature* 464, 297–301. doi: 10.1038/nature08783

Chang RB, Waters H, Liman ER. (2010) A proton current drives action potentials in genetically identified sour taste cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107(51):22320–5.

Chaudhari, N., and Roper, S. D. (2010). The cell biology of taste. *J. Cell Biol.* 190, 285–296. doi: 10.1083/jcb.201003144

Chevrot M, Bernard A, Ancel D, Buttet M, Martin C, Abdoul-Azize S, Merlin JF, Poirier H, Niot I, Khan NA, Passilly-Degrace P, Besnard P. (2013) Obesity alters the gustatory perception of lipids in the mouse: plausible involvement of lingual CD36. *J Lipid Res.* doi: 10.1194/jlr.M039446

Chraïbi, A., and Horisberger, J. D. (2002). Na self inhibition of human epithelial Na channel: temperature dependence and effect of extracellular proteases. *J. Gen. Physiol.* 120, 133–145. doi: 10.1085/jgp.20028612

Danziger Z. C., Grill W. M. (2015). Dynamics of the sensory response to urethral flow over multiple time scales in rat. *J. Physiol.* 593, 3351–3371. 10.1113/JP270911

Darvesh, S., Hopkins, D. A., Geula, C.(2003) Neurobiology of butyrylcholinesterase. *Nat Rev Neurosci*, 4 131-8

Deckmann, K., Filipski, K., Krasteva-Christ, G., Fronius, M., Althaus, M., Rafiq, A., et al. (2014). Bitter triggers acetylcholine release from polymodal urethral chemosensory

cells and bladder reflexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 8287–8292. doi: 10.1073/pnas.1402436111

Deckmann, K., and Kummer, W. (2016). Chemosensory epithelial cells in the urethra: sentinels of the urinary tract. *Histochem. Cell Biol.* 146, 673–683. doi: 10.1007/s00418-016-1504-x

DiPatrizio (2014) Is fat taste ready for primetime? *Physiol Behav.*;136:145-54. doi: 10.1016/j.physbeh.2014.03.002.

Du, S., Araki, I., Mikami, Y., Zakoji, H., Beppu, M., Yoshiyama, M., et al. (2007). Amiloride-sensitive ion channels in urinary bladder epithelium involved in mechanosensory transduction by modulating stretch-evoked adenosine triphosphate release. *Urology* 69, 590–595. doi: 10.1016/j.urology.2007.01.039

Duc, C., Farman, N., Canessa, C. M., Bonvalet, J. P., and Rossier, B. C. (1994). Cell-specific expression of epithelial sodium channel alpha, beta, and gamma subunits in aldosterone-responsive epithelia from the rat: localization by in situ hybridization and immunocytochemistry. *J. Cell Biol.* 127, 1907–1921. doi: 10.1083/jcb.127.6.1907

Edfalk, S., Steneberg P., Edlund H., (2008). Gpr40 Is Expressed in Enteroendocrine Cells and Mediates Free Fatty Acid Stimulation of Incretin Secretion. *Diabetes* 57(9): 2280–2287. doi: 10.2337/db08-0307

Finger, T. E., Bottger, B., Hansen, A., Anderson, K. T., Alimohammadi, H., and Silver, W. L. (2003). Solitary chemoreceptor cells in the nasal cavity serve as sentinels of respiration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 8981–8986. doi: 10.1073/pnas.1531172100

Finger, T. E., and Kinnamon, S. C. (2011). Taste isn't just for taste buds anymore. *F1000 Biol. Rep.* 3:20. doi: 10.3410/B3-20

Forssmann W. G., Ito S., Weihe E., Aoki A., Dym M., Fawcett D. W. (1977) An improved perfusion fixation method for the testis. *The Anatomical Record*;188: 307–314.

Garty, H., and Palmer, L. G. (1997). Epithelial sodium channels: function, structure,

and regulation. *Physiol. Rev.* 77, 359–396. doi: 10.1152/physrev.1997.77.2.359

Giraldez, T., Rojas, P., Jou, J., Flores, C., and Alvarez De La Rosa, D. (2012). The epithelial sodium channel delta-subunit: new notes for an old song. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 303, F328–F338. doi: 10.1152/ajprenal.00116.2012

Grando, S.A., D.A. Kist, M. Qi, and M.V. Dahl. (1993). Human keratinocytes synthesize, secrete, and degrade acetylcholine. *J Invest Dermatol.*;101(1):32-6.

Guo D., Liang S., Wang S., Tang C., Yao B., Wan W., et al. . (2016). Role of epithelial Na⁺ channels in endothelial function. *J. Cell Sci.* 129, 290–297. 10.1242/jcs.168831

Guy J., Wagener R. J., Mock M., Staiger J. F. (2015). Persistence of functional sensory maps in the absence of cortical layers in the somatosensory cortex of reeler mice. *Cereb. Cortex* 25, 2517–2528. 10.1093/cercor/bhu052

Hanna-Mitchell AT, Beckel JM, Barbadora S, Kanai AJ, de Groat WC, Birder LA.(2007) Non-neuronal acetylcholine and urinary bladder urothelium.*Life Sci.* ;80(24-25):2298-302.

Hanukoglu I., Hanukoglu A. (2016) Epithelial sodium channel (ENaC) family: Phylogeny, structure-function, tissue distribution, and associated inherited diseases..*Gene.* doi:10.1016/j.gene.2015.12.061

Heck, G. L., Mierson, S., and Desimone, J. A. (1984). Salt taste transduction occurs through an amiloride-sensitive sodium transport pathway. *Science* 223, 403–405. doi: 10.1126/science.6691151

Hendel SK, Kellermann L. , Hausmann A., Bindslev N., Jensen KB, Nielsen OH (2022) Tuft Cells and Their Role in Intestinal Disease. *Front. Immunol.*, Volume 13| doi.org/10.3389/fimmu.2022.822867

Höfer, D., and Drenckhahn, D. (1998). Identification of the taste cell G-protein, alpha-gustducin, in brush cells of the rat pancreatic duct system. *Histochem. Cell Biol.* 110, 303–309. doi: 10.1007/s004180050292

Höfer, D., Puschel, B., and Drenckhahn, D. (1996). Taste receptor-like cells in the rat

gut identified by expression of alpha-gustducin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 6631–6634. doi: 10.1073/pnas.93.13.6631

Huang, A. L., Chen, X., Hoon, M. A., Chandrashekar, J., Guo, W., Trankner, D., et al. (2006). The cells and logic for mammalian sour taste detection. *Nature* 442, 934–938. doi: 10.1038/nature05084

Huang YA, Maruyama Y, Stimac R, Roper SD (2008). Presynaptic (Type III) cells in mouse taste buds sense sour (acid) taste. *J Physiol.*; 586(12):2903–12.

Inada H., Kawabata F., Ishimaru Y., Fushiki T., Matsunami H., Tominaga M. Off-response property of an acid-activated cation channel complex PKD1L3–PKD2L1. *EMBO reports*. 2008; 9: 690–697

Ishimaru, Y., Inada, H., Kubota, M., Zhuang, H., Tominaga, M., and Matsunami, H. (2006). Transient receptor potential family members PKD1L3 and PKD2L1 form a candidate sour taste receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 12569–12574. doi: 10.1073/pnas.0602702103

Kellenberger, S., and Schild, L. (2002). Epithelial sodium channel/degenerin family of ion channels: a variety of functions for a shared structure. *Physiol. Rev.* 82, 735–767. doi: 10.1152/physrev.00007.2002

Kleyman, T. R., Kashlan, O. B., and Hughey, R. P. (2018). Epithelial Na⁽⁺⁾ channel regulation by extracellular and intracellular factors. *Annu. Rev. Physiol.* 80, 263–281. doi: 10.1146/annurev-physiol-021317-121143

Knoblaugh S., True L. (2012) Male Reproductive System. In *Treuting P. M., Dintzis S. M. Comparative Anatomy and Histology A Mouse and Human Atlas*. Elsevier.; SS. 285–308.

Krasteva, G., Canning, B. J., Hartmann, P., Veres, T. Z., Papadakis, T., Muhlfeld, C., et al. (2011). Cholinergic chemosensory cells in the trachea regulate breathing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 9478–9483. doi: 10.1073/pnas.1019418108

Krasteva, G., Canning, B. J., Papadakis, T., and Kummer, W. (2012). Cholinergic brush cells in the trachea mediate respiratory responses to quorum sensing molecules. *Life*

Sci. 91, 992–996. doi: 10.1016/j.lfs.2012.06.014

Kummer, W., and Deckmann, K. (2017). Brush cells, the newly identified gatekeepers of the urinary tract. *Curr. Opin. Urol.* 27, 85–92. doi: 10.1097/MOU.0000000000000361

Kummer, W., and G. Krasteva-Christ (2014). Non-neuronal cholinergic airway epithelium biology. *Curr Opin Pharmacol.* 2014 Jun;16:43-9. doi: 10.1016/j.coph.2014.03.001. Epub 2014 Mar 27. Review.

Kurzen, H., I. Wessler, C.J. Kirkpatrick, K. Kawashima, and S.A. Grando. (2007) The non-neuronal cholinergic system of human skin. *Horm Metab Res.* 39:125-135.

Lawton DM, Furness DN, Lindemann B, Hackney CM. (2000) Localization of the glutamate-aspartate transporter, GLAST, in rat taste buds. *Eur J Neurosci.*; 12(9):3163–71.

Lee R. J., and Cohen N. A. (2015). Taste receptors in innate immunity. *Cell. Mol. Life Sci.* 72, 217–236. doi: 10.1007/s00018-014-1736-7

Lewandowski BC, Sukumaran SK, Margolskee RF, Bachmanov AA. (2016) Amiloride-Insensitive Salt Taste Is Mediated by Two Populations of Type III Taste Cells with Distinct Transduction Mechanisms. *J Neurosci.*; 36(6):1942–53.

Li X. C., Shao Y., and Zhuo J. L. (2012). AT1a receptor signaling is required for basal and water deprivation-induced urine concentration in AT1a receptor-deficient mice. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 303, F746–F756. doi: 10.1152/ajprenal.00644.2011

Li Q., Kresge C., Bugde A., Lamphere M., Park J. Y., Feranchak A. P. (2016). Regulation of mechanosensitive biliary epithelial transport by the epithelial Na⁽⁺⁾ channel. *Hepatology* 63, 538–549. 10.1002/hep.28301

Lin W., Finger T. E., Rossier B. C., and Kinnamon S. C. (1999). Epithelial Na⁺ channel subunits in rat taste cells: localization and regulation by aldosterone. *J. Comp. Neurol.* 405, 406–420. doi: 10.1002/(SICI)1096-9861(19990315)405:3<406::AID-CNE10>3.0.CO;2-F

Lindemann B. (2001). Receptors and transduction in taste. *Nature* 413, 219–225. doi:

Lindemann B., Barbry P., Kretz O., and Bock R. (1998). Occurrence of ENaC subunit mRNA and immunocytochemistry of the channel subunits in taste buds of the rat vallate papilla. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 855, 116–127. doi: 10.1111/j.1749-6632.1998.tb10553.x

Lips K.S., J. Wunsch, S. Zarghooni, T. Bschleipfer, K. Schukowski, W. Weidner, I., Wessler, U. Schwantes, H. Koepsell, and W. Kummer (2007) Acetylcholine and molecular components of its synthesis and release machinery in the urothelium. *Eur Urol.* 51:1042-1053

Lopezjimenez N. D., Cavenagh M. M., Sainz E., Cruz-Ithier M. A., Battey J. F., and Sullivan S. L. (2006). Two members of the TRPP family of ion channels, Pkd1l3 and Pkd2l1, are co-expressed in a subset of taste receptor cells. *J. Neurochem.* 98, 68–77. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.03842.x

Luciano L., Groos S., Reale E. (2003) Brush cells of rodent gallbladder and stomach epithelia express neurofilaments. *J Histochem Cytochem.* Feb;51(2):187-98. doi: 10.1177/002215540305100207

McCloskey K. D., Vahabi B., Fry C. H. (2017). Is electrolyte transfer across the urothelium important? ICI-RS 2015. *Neurourol. Urodyn.* 36, 863–868. 10.1002/nau.23085

McDonald F. J., Price M. P., Snyder P. M., and Welsh M. J. (1995). Cloning and expression of the beta- and gamma-subunits of the human epithelial sodium channel. *Am. J. Physiol.* 268, C1157–C1163. doi: 10.1152/ajpcell.1995.268.5.C1157

Nelson G., Hoon M. A., Chandrashekar J., Zhang Y., Ryba N. J. and Zuker C. S. (2001). Mammalian sweet taste receptors. *Cell* 106, 381–390. doi: 10.1016/S0092-8674(01)00451-2

Peng C. W., Chen J. J., Cheng C. L., Grill W. M. (2008). Role of pudendal afferents in voiding efficiency in the rat. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 294, R660–R672. 10.1152/ajpregu.00270.2007

Perniss A., Schmidt P., Soultanova A., Papadakis T., Dahlke K., Voigt A., Schütz B., Kummer W., Deckmann K. (2021). Development of epithelial cholinergic chemosensory cells of the urethra and trachea of mice. *Cell Tissue Res.* 385(1): 21–35.doi: 10.1007/s00441-021-03424-9

Perniss A., Boonen B., Tonack S., Thiel M., Poharkar K., Wessam Alnouri M., Keshavarz M., Papadakis T., Wiegand S., Pfeil U., Richter K., Althaus M., Oberwinkler J., Schütz B., Boehm U., Offermanns S., Leinders-Zufall T., Zufall F., Kummer W.(2023) A succinate/SUCNR1-brush cell defense program in the tracheal epithelium, *Sci Adv.* ;9(31):eadg8842. doi: 10.1126/sciadv.adg8842

Riedel I., Liang F. X., Deng F. M., Tu L., Kreibich G., Wu X. R., et al. . (2005). Urothelial umbrella cells of human ureter are heterogeneous with respect to their uroplakin composition: different degrees of urothelial maturity in ureter and bladder? *Eur. J. Cell Biol.* 84, 393–405. 10.1016/j.ejcb.2004.12.011

Romih R., Korošec P., Mello W.de, Jezernik K. (2005) Differentiation of epithelial cells in the urinary tract. *Cell and Tissue Research.* 259–268

Rosario B. Jaime-Lara, Brianna E. Brooks, Carlotta Vizioli, Mari Chiles, Nafisa Nawal, Rodrigo S. E. Ortiz-Figueroa, Alicia A. Livinski, Khushbu Agarwal, Claudia Colina-Prisco, Natalia Iannarino, Aliya Hilmi, Hugo A. Tejeda, and Paule V. Joseph (2022) A systematic review of the biological mediators of fat taste and smell, *Physiol Ref.* 103(1):855-918. doi: 10.1152/physrev.00061.2021

Rosenberry, T. L. (1975). Acetylcholinesterase. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, 43 103-218.

Schmidt P. (2021) Urethrale cholinerge chemosensorische Zellen
initiieren eine neurogene Entzündung als Reaktion auf den Bitterstoff Denatonium

Schmidt P., Perniss A., Bodenbenner-Tuerich M., Wiegand S., Briand L., Deckmann K. (2024) Tas1R3 dependent and independent recognition of sugars in the urethra and the role of tuft cells in this process

Schütz B., Jurastow I., Bader S., Ringer C., Von Engelhardt J., Chubanov V., et al. (2015). Chemical coding and chemosensory properties of cholinergic brush cells in the mouse gastrointestinal and biliary tract. *Front. Physiol.* 6:87. doi: 10.3389/fphys.2015.00087

Sheng S., Bruns J. B., and Kleyman T. R. (2004). Extracellular histidine residues crucial for Na⁺ self-inhibition of epithelial Na⁺ channels. *J. Biol. Chem.* 279, 9743–9749. doi: 10.1074/jbc.M311952200

Smith P. R., Mackler S. A., Weiser P. C., Brooker D. R., Ahn Y. J., Harte B. J., et al. . (1998). Expression and localization of epithelial sodium channel in mammalian urinary bladder. *Am. J. Physiol.* 274, F91–F96. 10.1152/ajprenal.1998.274.1.F91

Tallini, Y. N., Shui, B., Greene, K. S., Deng, K. Y., Doran, R., Fisher, P. J., et al. (2006). BAC transgenic mice express enhanced green fluorescent protein in central and peripheral cholinergic neurons. *Physiol. Genomics* 27, 391–397. doi: 10.1152/physiolgenomics.00092.2006

Todd J. K. (1964). Afferent impulses in the pudendal nerves of the cat. *Q. J. Exp. Physiol. Cogn. Med. Sci.* 49, 258–267. 10.1113/expphysiol.1964.sp001730

Treuting P. M., Kowalewska J. (2012) Urinary System. *In Treuting P. M., Dintzis S. M. Comparative Anatomy and Histology A Mouse and Human Atlas*. Elsevier.; SS. 229-251.

Vandenbeuch, A., Clapp, T. R., and Kinnamon, S. C. (2008). Amiloride-sensitive channels in type I fungiform taste cells in mouse. *BMC Neurosci.* 9:1. doi: 10.1186/1471-2202-9-1

Welsch U. (2003) Lehrbuch Histologie, *Urban & Fischer*.

Wessler IK, Kirkpatrick CJ. (2001) The Non-neuronal cholinergic system: an emerging drug target in the airways. *Pulm Pharmacol Ther.*;14(6):423-34.

Wessler IK, Kirkpatrick CJ (2008) Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. *Br J Pharmacol*, 154 1558-71.

Wichmann L., Vowinkel K. S., Perniss A., Manzini I., and Althaus M. (2018). Incorporation of the delta-subunit into the epithelial sodium channel (ENaC) generates protease-resistant ENaCs in *Xenopus laevis*. *J. Biol. Chem.* 293, 6647–6658. doi: 10.1074/jbc.RA118.002543

Widmayer P, Hischer L, Hennemann K, Kusumakshi S, Boehm U, Breer H. (2018) *Long-chain fatty acid-induced intracellular signaling in GPR120-expressing brush cells at the limiting ridge of the murine stomach*. *Cell Tissue Res*. doi: 10.1007/s00441-018-2972-1.

Zhang J. , Jin H., Zhang W., Ding C., O’Keeffe S., Ye M., Zuker C. S. (2019) Sour Sensing from the Tongue to the Brain. *Cell*. 179(2):392-402.e15. doi: 10.1016/j.cell.2019.08.031

10. Publikationsverzeichnis

Kandel C, Schmidt P, Perniss A, Keshavarz M, Scholz P, Osterloh S, Althaus M, Kummer W, Deckmann K, 2018. ENaC in Cholinergic Brush Cells. *Front Cell Dev Biol.* Aug 15;6:89. doi: 10.3389/fcell.2018.00089.

11. 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 nichtveröffentlichten 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 nachstehend spezifiziert. 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

12. Danksagung

Diese Arbeit wäre sicherlich nicht ohne die Hilfe vieler verschiedener Menschen in meinem Leben zustande gekommen.

Zunächst danke ich Herrn Prof. Dr. Wolfgang Kummer, der mir das Thema der Arbeit und die materiellen Ressourcen zur Durchführung der Experimente zur Verfügung stellte und viel Geduld mit mir hatte.

Herzlichst möchte ich auch Herrn PD Dr. Klaus Deckmann danken, der ebenfalls sehr viel Geduld mit mir hatte und tatkräftig in allen möglichen Bereichen Unterstützung lieferte. Ohne ihn hätte ich diese Arbeit wahrscheinlich nie fertig gestellt. Mit ihm hat das Ganze wirklich Spaß gemacht und ich bin stolz, seine erste Doktorandin gewesen sein zu dürfen.

Martin Bodenbrenner danke ich dafür, dass ich jederzeit alle möglichen und unmöglichen Fragen stellen durfte und für eine wunderbare Einarbeitung in alle Methoden und das Ausgleichen häufig geschehener Fehler. Zudem auch für die zahlreichen Pausenversorgungen.

Ebenso danke ich Tamara Papadakis, die mir ebenfalls eine gute Einführung in die Methoden gegeben hat.

Karola Michel danke ich für die Unterstützung beim Bearbeiten von Grafiken.

Patricia Berger danke ich für viele interessante Gespräche, administrative Hilfestellungen und dafür, dass sie die gute Seele des Instituts ist.

Ich danke Silke W., Stephanie W., Innokentij J., Chen C. Lukas D., Patricia S., Alexander P., also den vielen netten Leuten und Freunden, die ich in meiner Zeit im Institut kennen lernen durfte und die mich mental zu jederzeit unterstützt und die Pausen deutlich lustiger gestaltet haben.

Meinen Eltern danke ich, dass sie mir so viele Dinge im Leben ermöglicht haben und immer noch ermöglichen und nie den Glauben an mich verlieren. Meinem Vater, dass er mich immer dazu motiviert, mein Bestes zu geben und meiner Mutter, dass sie mich daran erinnert, dabei nicht hochmütig zu werden.

Auch danke ich meinem Ehemann Lennart, der mir in den letzten Zügen dieser Dissertation die nötige Motivation gegeben hat.

Zuletzt danke ich allen, die vielleicht nicht namentlich erwähnt wurden und trotzdem zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.