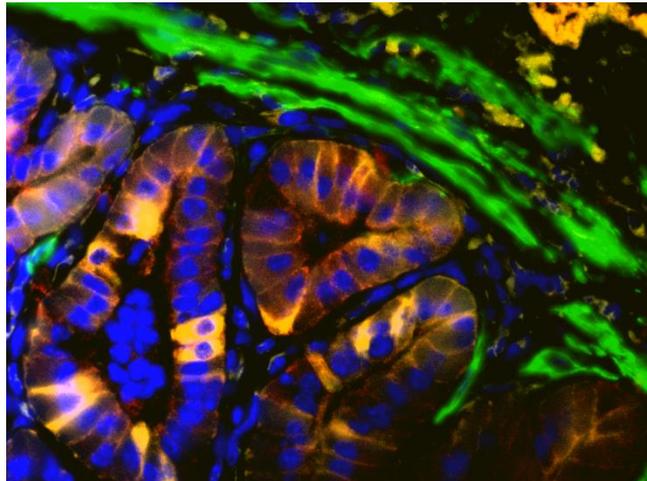


Antworten des intrazellulären Kalziums glatter Muskelzellen der Gallenblase nach Bittersubstanzstimulation

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



vorgelegt von Meiners, Mirjam
aus Detmold

Gießen 2023

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen
Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Kummer

Gutachter: Prof. Dr. Philip Hardt

Tag der Disputation: 11. Oktober 2023

1.	Einleitung	1
1.1	Gallenblase - Anatomie und Funktion.....	1
1.1.1	Makroskopischer Aufbau	1
1.1.2	Mikroskopischer Aufbau	2
1.1.3	Funktion der Gallenblase.....	2
1.1.4	Mechanismen der Gallenblasenentleerung	3
1.2	Die Wahrnehmung von Bittersubstanzen	4
1.3	Bürstenzellen	6
1.4	Aufbau und Funktion glatter Muskulatur der Gallenblase	8
1.5	Effekte von Bittersubstanzen auf glatte Muskulatur	13
1.6	Ziel der Arbeit	14
2.	Material und Methoden	15
2.1	Allgemein verwendete Materialien und Geräte.....	15
2.2	Verwendete Puffer und Fixative.....	16
2.2.1	Tyrode III.....	16
2.2.2	Phosphatpuffer und Zamboni-Fixativ.....	17
2.2.3	Phosphat-gepufferte-Salzlösung (Phosphate buffered saline, PBS).....	18
2.3	Versuchstiere	18
2.4	Organentnahme.....	19
2.5	Kalziummessungen im Organpräparat	19
2.5.1	Organverarbeitung	19
2.5.2	Vorbereitung für die Kalziummessung am Organpräparat.....	20
2.6	Kalziummessung mit Zelllinien.....	22
2.6.1	Vorbereiten der Deckgläschen.....	22
2.6.2	Reporterzellen.....	23
2.7	Zellisolation	24

2.7.1	Vorbereitung für die Kalziummessungen an isolierten Zellen	25
2.8	Kalziummessung	26
2.9	In silico-Analyse von scRNA-Seq-Daten zur Expression von CCK- und Bitterrezeptoren in der Gallenblase	27
2.10	Immunhistochemie	28
2.10.1	Versuchstiere und Gewebeentnahme	28
2.10.2	Paraffinschnitte	28
2.10.2.1	Entparaffinieren	29
2.10.3	Gefrierschnitte.....	30
2.10.4	Antikörperinkubation.....	30
2.10.5	Fluoreszenzmikroskopische Auswertung	32
2.10.6	Kontrollen	33
3.	Ergebnisse	34
3.1	Kalziummessungen am Organpräparat.....	34
3.2	Kalziummessungen an M3WT4-Reporterzellen	35
3.2.1	Calcium Orange.....	35
3.2.2	Fluo4.....	36
3.3	Untersuchung der glatten Muskelzellen der Gallenblase auf das Vorhandensein von CCK- und Bitterrezeptoren.....	38
3.4	Kalziummessungen an isolierten Zellen der Gallenblase.....	39
3.4.1	Test auf Normalverteilung der Kalziumanstiege.....	39
3.4.2	Messungen des intrazellulären Kalziums nach Gabe von Denatonium	40
3.4.3	Messungen des intrazellulären Kalziums nach Gabe von Dextromethorphan	50
3.4.4	Messungen des intrazellulären Kalziums nach Gabe von Quinin	59
3.5	Kalziummessungen an isolierten Zellen der Gallenblase von genetisch veränderten Mausstämmen	66

3.5.1 Messungen des intrazellulären Kalziums nach Gabe von DXM an Zellen der Gallenblase von TRPM5-KO-Mäusen	67
3.5.2 Vergleich der Anstiege des intrazellulären Kalziums nach Gabe von DXM von Zellen der TRPM5-KO-Mäuse zu Zellen von TRPM5-WT-Mäusen	73
3.5.3 Messungen des intrazellulären Kalziums nach Gabe von Quinin an Zellen der Gallenblase von TRPM5-KO-Mäusen	81
3.5.4 Vergleich der Anstiege des intrazellulären Kalziums nach Gabe von Quinin zwischen Zellen der Gallenblasen von TRPM5-KO-Mäusen zu Zellen der Gallenblasen von TRPM5-WT-Mäusen.....	87
3.6 Ergebnisse der Immunhistochemie.....	94
4. Diskussion	96
4.1 Effekte von Bittersubstanzen auf die glatte Muskulatur der Gallenblase von Mäusen.....	97
4.1.1 Reaktionen glatter Muskelzellen auf Denatonium	97
4.1.2 Vergleich der Reaktionen CCK ⁻ -Zellen mit CCK ⁺ -Zellen auf Denatonium	98
4.1.3 Reaktionen glatter Muskelzellen auf DXM und Quinin.....	99
4.1.4 Vergleich der Reaktionen CCK ⁻ -Zellen mit CCK ⁺ -Zellen auf DXM und Quinin	101
4.1.5 Desensitivierung der glatten Muskelzellen auf Bittersubstanzen nach mehrfacher Stimulation	103
4.2 Involvierung von Elementen der Geschmackstransduktionskaskade in die Effekte von Bittersubstanzen auf die glatte Muskulatur	105
4.2.1 Abhängigkeit der Kalziumanstiege in glatten Muskelzellen von TRPM5	105
4.2.2 Elemente der Geschmackstransduktionskaskade in glatter Muskulatur.....	108
5. Schlussfolgerungen	109
6. Zusammenfassung	110
7. Summary	111
Literaturverzeichnis.....	111

Publikationsverzeichnis.....	129
Ehrenwörtliche Erklärung	130

1. Einleitung

1.1 Gallenblase - Anatomie und Funktion

1.1.1 Makroskopischer Aufbau

Die Gallenblase (Vesica biliaris) ist beim Menschen ein etwa 4x7x11 cm großes, birnenförmiges Hohlorgan, das am kaudalen Leberpol in der Fossa vesicae biliaris lokalisiert ist. Längst nicht alle Säugetiere besitzen eine solche Gallenblase. Die Ratte beispielsweise besitzt im Gegensatz zu ihren nahen Verwandten, den Mäusen, keine [38]. In dieser Arbeit wurden Experimente mit den Gallenblasen von Mäusen durchgeführt, die im Gegensatz zu den Gallenblasen des Menschen, nur wenige Millimeter groß sind. Die Gallenblase speichert und konzentriert die in der Leber produzierte Gallenflüssigkeit, die für die Verdauung von Fetten im Darm benötigt wird. Normalerweise fasst die Gallenblase des Menschen etwa 30 mL Galle. Anatomisch gliedert sich die Gallenblase in Fundus (Fundus vesicae biliaris), Körper (Corpus vesicae biliaris) und Hals (Collum vesicae biliaris). An den Hals schließt sich der 3-4 cm lange Ductus cysticus an, der wiederum zusammen mit dem Ductus hepaticus communis den Ductus choledochus bildet (Abbildung 1). Der Ductus choledochus verläuft im Ligamentum hepatoduodenale und mündet über die Papilla duodeni major (Papilla VATERI) in das Duodenum [138].

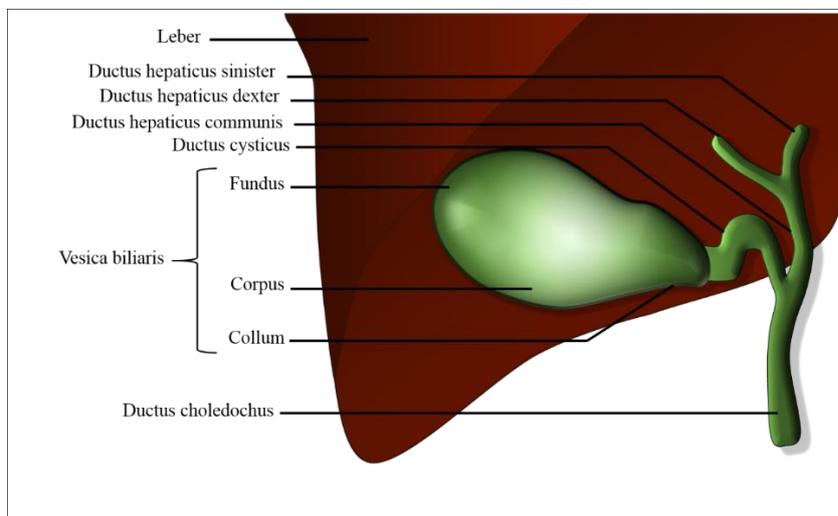


Abbildung 1
Vereinfachte
Darstellung der
Gallenblase im
Leberbett.

Der Fluss der Galle in das Duodenum wird über den Musculus sphincter Oddi reguliert. Dabei handelt es sich um einen Komplex glatter Muskulatur, welcher strategisch günstig an dem Zusammenfluss des Ductus hepaticus communis und des Ductus pancreaticus vor der Einmündung in das Duodenum liegt. Der Sphincter kontrolliert den Fluss der Gallen- und Pankreassekrete und verhindert gleichzeitig den Reflux von duodenalem Inhalt [128].

Er besitzt eine myogene Eigenaktivität, wird jedoch durch neurohumorale Faktoren wie Sekretin stimuliert und gesteuert [50].

1.1.2 Mikroskopischer Aufbau

Die Wand der Gallenblase lässt sich in 3 Schichten gliedern (von innen nach außen): Tunica mucosa, Tunica muscularis und Tunica serosa (die der Bauchhöhle zugewandte Seite) bzw. Tunica adventitia (die der Leber zugewandte Seite).

Die Tunica mucosa umfasst das einschichtige, hochprismatische Oberflächenepithel (Lamina epithelialis), in dem sich unter anderem auch die Bürstenzellen (s.u.) mit ihren zahlreichen Mikrovilli [126] befinden. Außerdem umfasst die Tunica mucosa auch die Lamina propria. Das Schleimhautrelief ist unregelmäßig und wirft hohe Falten auf. Je nach Füllungszustand der Gallenblase zeigt sich ein unterschiedliches Bild. Während die Falten im ungefüllten Zustand eher kompakt und parallel verlaufen, bilden sie im gefüllten Zustand „ein netzartiges System breiter und schmaler niedriger Falten“ [142]. Eine Besonderheit zeigt das Epithel des Gallenblasenhalses, in dem sich muköse Drüsen befinden. Zwischen den Falten der Mukosa verlaufen taschenförmige Krypten, die sogenannten Luschka-Kanälchen. Die einschichtige Tunica muscularis wird durchzogen von Bindegewebe [131]. Sie enthält die glatte Muskulatur, welche „scherengitterartig“ angeordnet ist [70].

1.1.3 Funktion der Gallenblase

Die Gallenblase speichert die in der Leber produzierte Galle zwischen den Mahlzeiten. Die menschliche Leber produziert dabei etwa 0,6 bis 1,2 Liter Galle pro Tag [50], wovon etwa die Hälfte direkt in das Duodenum gelangt, die andere Hälfte wird in der Gallenblase gespeichert [92]. Die Gallensäure setzt sich aus vielen verschiedenen Komponenten zusammen. Die Konzentrationen der jeweiligen Inhaltsstoffe in Leber und Gallenblase unterscheidet sich, was durch die Fähigkeit der Gallenblase zur Konzentration der Gallensäure um den Faktor 10-20 bedingt ist [50, 92]. Wasser macht unter all den Komponenten zusammen mit den Gallensalzen den größten Teil aus. Weiterhin ist die Galle ein Hauptausscheidungsweg für Cholesterin. Dazu kommen Bilirubin, Lecithin, Fettsäuren und eine Reihe an Elektrolyten, die in ihrer Konzentration der des Blutplasmas ähneln.

Die motorische Funktion der Gallenblase wird unter anderem über die Gallensäure durch membranständige Gallensäurenrezeptoren (G-protein-coupled bile acid receptor, Gpbar1: TGR5) und durch neurohormonelle Signale, die mit der Verdauung im Zusammenhang stehen, reguliert. Beispiele für diese neurohormonellen Signale sind Cholezystokinin (CCK) und FGF15/19 (fibroblast growth factors). Sie triggern die Entleerung, beziehungsweise die Wiederauffüllung. So kontrolliert die Gallenblase den Fluss von Galle in den Darm und damit auch den enterohepatischen Kreislauf der Gallensäuren [43].

1.1.4 Mechanismen der Gallenblasenentleerung

Die Gallenblasenentleerung wird über verschiedene Mechanismen gesteuert, von denen einer der wichtigsten die hormonelle und neuronale Steuerung ist. Darunter ist CCK der wohl wichtigste Vertreter. Es sorgt für die rhythmischen Kontraktionen der Gallenblasenwand, die dafür sorgen, dass die Galle in den Ductus cysticus und damit auch in den Ductus choledochus und das Duodenum abgegeben werden kann [50]. CCK ist ein Peptidhormon, das für die Verarbeitung von Fetten benötigt wird. Es wird nach Stimulation von Fettsäuren, Aminosäuren und Peptiden in den I-Zellen des Duodenums und Jejunums gebildet. Die aktive Sequenz ist das C-terminale Octapeptid (CCK 8). Es bewirkt neben der Kontraktion der Gallenblase auch eine Induktion der Pankreasenzymsekretion, potenziert die Sekretinwirkung und hemmt die Salzsäuresekretion im Magen [92]. An der Gallenblase wirkt CCK zum einen direkt über Rezeptoren an der glatten Muskulatur und zum anderen stimuliert es präsynaptisch die Freisetzung von Acetylcholin (ACh) an cholinergen Nerven [77]. Für die effektive Entleerung der Galle in das Duodenum ist neben der Kontraktion der Gallenblase eine rechtzeitige Erschlaffung des Musculus sphincter Oddi entscheidend. Dazu muss nach Kontraktion der Gallenblase der Basaldruck durch den Sphincter Oddi sinken, welcher 3 mmHg höher ist, als der im Ductus cysticus und Ductus pancreaticus [50]. Dieser erhöhte Druck sorgt dafür, dass eine Entleerung durch reine Kontraktion nicht möglich wäre. Während CCK in der Gallenblase für eine Kontraktion sorgt, hat es relaxierende Effekte auf die Sphinktermuskulatur, indem es cholinerge Nerven aktiviert, die wiederum inhibitorische Neurone der Sphinktermuskulatur aktivieren. Durch die Gallenblasenkontraktion wird eine peristaltische Welle von Relaxation in Gang gesetzt, welche den Sphinkter inhibiert. Ein dritter Faktor, der die Relaxation des Sphinkters provoziert, ist die intestinale Peristaltik des Duodenums selbst. Dabei existiert ein neuraler Schaltkreis zwischen Duodenum und Sphinkter, welcher über Projektionen des myenterischen Plexus der

Duodenalschleimhaut auf die Sphinktermuskulatur funktioniert und eine starke Relaxation dieser auslöst. Die dadurch entstehende Drucksenkung im Ductus choledochus führt zu einer Entleerung der Galle [50, 105].

1.2 Die Wahrnehmung von Bittersubstanzen

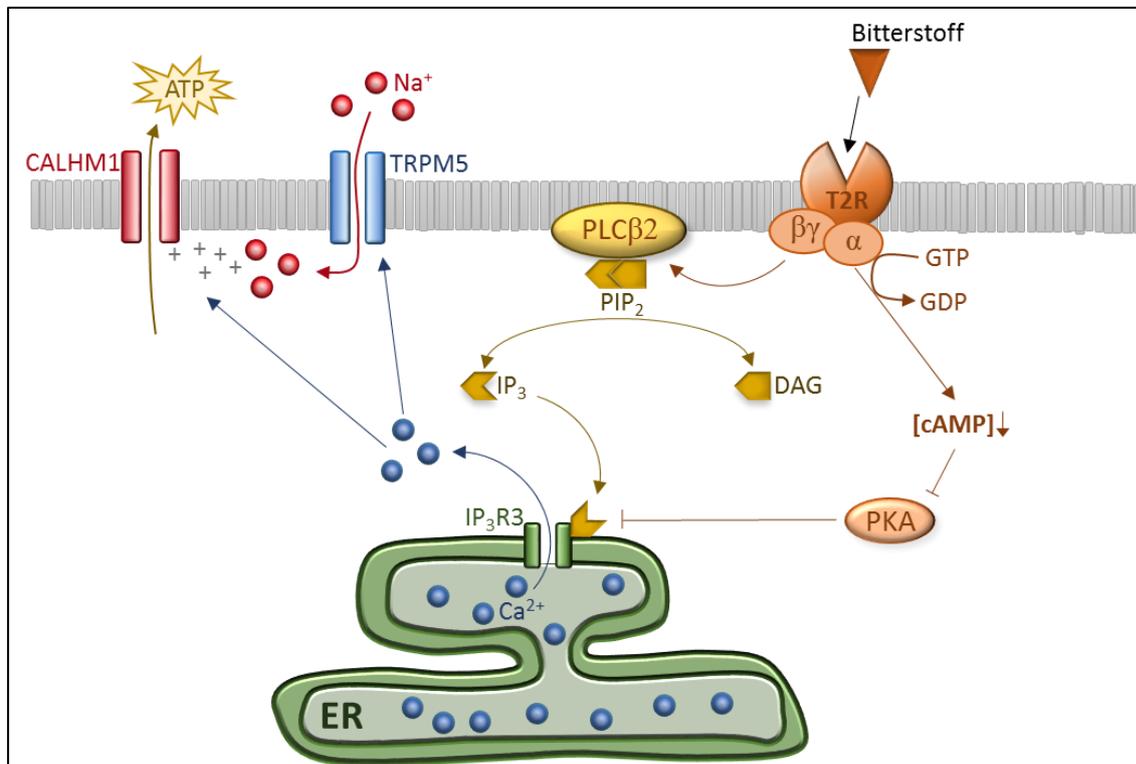


Abbildung 2 Mechanismus der bitter-induzierten Geschmackstransduktionskaskade in einer Typ-II-Rezeptorzelle. Bitterstoff bindet an G-Protein-gekoppelten Rezeptor TAS2R und aktiviert Phospholipase-C beta-2 (PLCβ2). Erhöhung des intrazellulären Kalziums über Bindung von Inositol 1,4,5-Trisphosphat (IP₃) an das Endoplasmatisches Retikulum (ER) über Ionenkanal IP₃R3. Kalzium öffnet TRPM5-Kanäle (Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily M Member 5). Es kommt zum Natriumeinstrom und zur Membrandepolarisation, die Calcium homeostasis modulator 1 (CALHM1) öffnet. Daraus folgt Adenosintri-phosphat-Freisetzung (ATP). Abkürzungen: Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat (PIP₂), Diacylglycerol (DAG), Guanosintri-phosphat (GTP), Guanosindiphosphat (GDP), zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP), Proteinkinase A (PKA).

Bitter gehört genau wie süß, salzig, sauer und umami zu den sogenannten Grundgeschmacksrichtungen. Während salzig und sauer in der Zunge über eigene Zellen mit speziellen Transduktionskaskaden wahrgenommen werden [44, 45, 134], läuft die Wahrnehmung von bitter, süß und umami über den gleichen Zelltyp (Typ II-Rezeptorzellen) und ähnliche Mechanismen ab [13, 75, 121]. Bittersubstanzen werden über Rezeptoren der Familie T2R, auch TAS2R genannt (taste receptors, Geschmacksrezeptoren), wahrgenommen. Je nach Spezies existieren in dieser Familie unterschiedlich viele Mitglieder. Es handelt sich dabei um G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) [2, 14, 19]. TAS2R durchspannt mit sieben Transmembrandomänen die Zellmembran und

detektiert Bittersubstanzen im extrazellulären Milieu [8]. Beispiele für Bitterverbindungen, die an TAS2R binden, sind die Ammoniumverbindung Denatoniumbenzoat (auch Denatonium, Den) oder das Alkaloid Quinin [17, 80, 108, 114].

An TAS2R gebunden ist ein heterodimeres G-Protein, das in seiner aktivierten Form aus den Untereinheiten $G\alpha$ -Gustducin und seinem $\beta\gamma$ -Partner $G\beta_1$ und γ_{13} besteht [16, 23, 150, 150]. Die Reaktion der Zelle auf Bittersubstanzen verläuft durch eine Aktivierung dieses G-Proteins auf zwei Wegen. Die erste Signalkaskade verläuft über die $G\beta\gamma$ -Untereinheit, welche ihrerseits die Phospholipase-C beta-2 (PLC β 2) aktiviert, an dessen β_2 -Untereinheit sie funktionell gebunden ist [52, 108]. Diese wiederum bildet aus PIP₂ die Second Messenger DAG und IP₃ [21, 23, 124, 147]. IP₃ führt über eine Bindung an einen spezifischen Rezeptor vom Typ III (IP₃R3) am endoplasmatischen Retikulum (ER) zu einer Freisetzung des intrazellulären Kalziums [23, 81, 124, 148]. Die Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration öffnet den transienten, spannungsabhängigen Rezeptorpotentialkationenkanal TRPM5 (Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily M Member 5), wodurch es zu einem depolarisierenden Natriumeinstrom kommt [99]. TRPM5 ist ein Ionenkanal, der auf schnelle Änderungen der Konzentration des intrazellulären Kalziums reagiert, wie es beispielsweise bei der IP₃-vermittelten Ausschüttung aus dem ER der Fall ist und daraufhin für monovalente Kationen permeabel wird. Langsame Änderungen der Konzentration des intrazellulären Kalziums haben jedoch keinen Effekt auf diesen Kanal [99]. Die Depolarisation der Zellmembran öffnet den Calcium homeostasis modulator 1, über den Adenosintriphosphat (ATP) freigesetzt wird, was wiederum afferente Nervenfasern stimuliert (Abbildung 2) [107, 150].

Nach Bindung der Bittersubstanz aktiviert TAS2R außerdem die $G\alpha$ -Untereinheit α -Gustducin, dessen genaue Rolle noch nicht abschließend geklärt ist. Es ist nah verwandt mit α -Transducin, was an der Signaltransduktion beim Sehprozess beteiligt ist [78, 109]. α -Gustducin wird spezifisch in geschmacksrezeptiven Zellen exprimiert und ist unter anderem an der Signaltransduktionskaskade für die Geschmacksqualität bitter beteiligt, wobei es auch eine Rolle bei der Wahrnehmung von süß und umami spielt [16, 125, 144]. Über eine mögliche Kopplung an eine Phosphodiesterase scheint α -Gustducin nach Stimulation durch Bittersubstanzen den Spiegel von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) zu senken [147], was eine Phosphorylierung und Desensitivierung von nachgeschalteten Kalziumsignaleffektoren verhindert, indem die

Proteinkinase A (PKA) weniger aktiviert wird (Abbildung 2). Das hält die Geschmackszellen in einem aktivierten Zustand, sodass sie auf Bitterstimuli mit einem kräftigen Anstieg der Konzentration des intrazellulären Kalziums reagieren [150].

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass an der Wahrnehmung von Bittersubstanzen viele verschiedene Komponenten beteiligt sind, die im Detail noch nicht vollständig verstanden sind. Essentiell für die Geschmackswahrnehmung bitter in den Geschmackspapillen der Zunge sind also die GPCR der Familie TAS2R mit ihren gekoppelten G-Protein α -Gustducin, G β 1 und γ 13, die PLC β 2 und die kalziumvermittelte Öffnung von TRPM5.

Diese Ausstattung und damit auch die Fähigkeit bestimmte Geschmäcker wahrzunehmen ist jedoch keine alleinige Fähigkeit der Zellen der Geschmackspapillen. Es wurden auch in vielen anderen Organen, wie beispielsweise der Trachea, der Urethra und dem Gastrointestinaltrakt, darunter auch in der Gallenblase, Zellen entdeckt, die diese Merkmale aufweisen. Im Folgenden soll darauf genauer eingegangen werden.

1.3 Bürstenzellen

Bürstenzellen wurden in vielen verschiedenen Säugetieren gefunden, inklusive dem Menschen [9, 84, 103, 104, 139]. Charakteristisch für diese Zellart ist ein apikaler Saum von Mikrovilli. Man fand die Zellen in weiteren Teilen des Gastrointestinaltraktes [39, 42, 145], darunter auch in der Gallenblase [67], in weiteren Teilen der oberen und unteren Atemwege [26, 30, 59, 69, 79, 101] sowie in der Urethra [25]. Man fand heraus, dass diese Zellen eine molekulare Kaskade aufweisen, die der des Geschmacksepithels der Zunge ähnelt. Viele Elemente der kanonischen Geschmackstransduktionskaskade in den Bürstenzellen, wie die PLC β 2 [108], TRPM5 [40, 51, 94] und α -Gustducin [39], wurden bereits entschlüsselt, wobei einige Elemente weiterhin ungeklärt sind. So entstand die Annahme, dass die Zellen chemosensorische Funktionen haben, die möglicherweise dazu dienen, schädliche Substanzen in der Umgebung zu erkennen und Abwehrreaktionen einzuleiten oder zu fördern [79, 116]. In Abhängigkeit vom Organabschnitt fand man Geschmacksrezeptoren, die in der Zunge für die Qualitäten „bitter“, „umami“ und „süß“ verantwortlich wären aus den Familien TAS1R und TAS2R [31, 39, 145]. Insbesondere in der Gallenblase konnten diese Geschmacksrezeptoren allerdings bisher nicht nachgewiesen werden [85]. Stattdessen fand man insbesondere im Bereich des Dünndarms den Succinat-Rezeptor SUCNR1 und identifizierte Bürstenzellen hier als

wesentliche Quelle für IL-25 und damit als wichtigen Teil zur Einleitung von Typ-2-Immunantworten [85].

Ogura et al. zeigten die Expression der Cholinacetyltransferase (ChAT) und des vesikulären Acetylcholintransporters und entdeckten damit ACh als potentiellen Transmitter der Bürstenzellen [88]. Deckmann et al. zeigten, dass Bittersubstanzen in Bürstenzellen der Urethra zu einer Ausschüttung von ACh führen [25].

In der Gallenblase zeigt die Betrachtung der gesamten Epitheloberfläche mittels Elektronenmikroskopie, dass die Bürstenzellen besonders zahlreich im Collum und Fundus vertreten sind, während sie in der Corpusregion nur vereinzelt auftauchen. Dieses Verteilungsmuster wurde bereits als erster Hinweis auf eine mögliche Funktion gedeutet. Beim Menschen hingegen konnten die Bürstenzellen in der Gallenblase bisher noch nicht nachgewiesen werden, dafür jedoch in den extrahepatischen Gallenwegen und bei der Ratte, welche keine Gallenblase besitzt, in den intrahepatischen Gallenwegen [120]. Diese Zellen enthalten Ionenkanäle und Enzyme, die mit der Sekretion von Bikarbonat (HCO_3^-), Chlorid- und Natriumionen in Verbindung stehen. Beispielsweise wurden in den Mikrovilli und entlang der basolateralen Membran unter anderem der Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) und $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher (AE_2) gefunden. Den $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ Cotransporter (NBC), welcher an der HCO_3^- -Produktion beteiligt ist, fand man ebenfalls in der basolateralen Membran. Da die Immunreaktivität für diese Proteine in den Hauptzellen des Gallengangepithels nicht oder nur sehr schwach vorhanden war, suggerierte man, dass die Bürstenzellen eine wesentliche Quelle für Bicarbonat in der Galle darstellen [87]. Außerdem fand man heraus, dass die Zellen das Synthesenzym für die Acetylcholinsynthese, die ChAT, sowie TRPM5, einen Teil der kanonischen Geschmackstransduktionskaskade, exprimieren [32, 119]. Man geht davon aus, dass die Bürstenzellen in der Gallenblase, so wie auch in den anderen Organen, eine Funktion als Wächterzellen einnehmen, die die Gallenblase und Gallenwege vor dem intestinalen Mikrobiom schützen sollen, indem sie bakteriell sezernierte Substanzen „schmecken“ und daraufhin acetylcholin-vermittelte Reflexe, wie beispielsweise die Entleerung der Gallenblase bewirken [119, 120].

1.4 Aufbau und Funktion glatter Muskulatur der Gallenblase

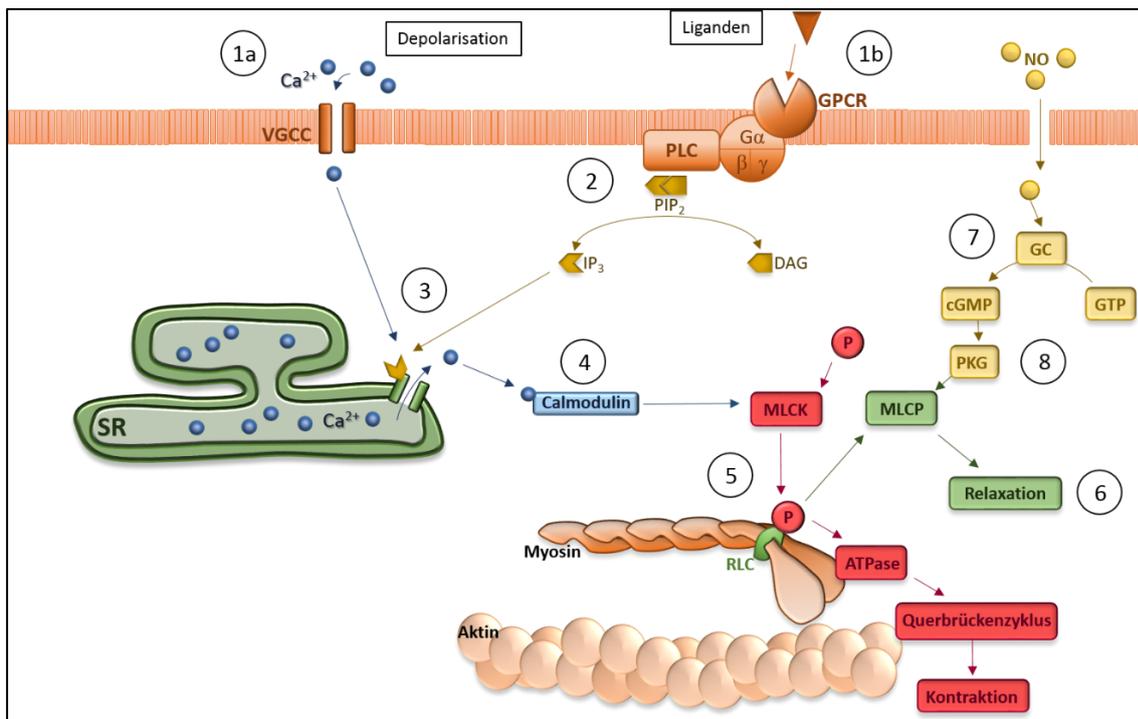


Abbildung 3 Regulation der Kontraktion von glatter Muskulatur. (1a) Depolarisation spannungsabhängiger L-Typ-Kalzium-Kanälen (Voltage Gated Calcium Channel, VGCC) und/ oder (1b) Ligandengesteuerte Aktivierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (G-protein-coupled receptors, GPCR). (2) Aktivierung der Phospholipase C (PLC) durch G-Protein. Die PLC produziert aus Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂): Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP₃). DAG aktiviert zusammen mit Kalzium die Proteinkinase C (PKC, hier nicht dargestellt), welche spezifische Proteine phosphoryliert und einen kontraktionsfördernden Effekt ausübt. (3) IP₃ bindet an spezifische Rezeptoren am sarkoplasmatischen Retikulum (SR), was einen Kalziumausstrom bewirkt. Die Aktivität des VGCC beeinflusst die Aktivität des IP₃-Rezeptors und damit den Kalziumausstrom aus dem SR [46]. (4) Freiwerdendes Kalzium bindet, dieses aktivierend, an Calmodulin. Aktivierung der Myosin-leichte-Ketten-Kinase (myosin light chain kinase, MLCK). (5) Die MLCK phosphoryliert (P) die Myosin-regulatorische-leichte-Kette (RLC), was zu einer Konformationsänderung im Myosinkopf und zu einer Steigerung der ATPase-Aktivität führt. Myosin und Aktin interagieren im Sinne des Querbrückenzyklus miteinander und es kommt zu einer Kontraktion. (6) Im aktiven Zustand dephosphoryliert die Myosin-leichte-Ketten-Phosphatase (myosin light chain phosphatase, MLCP) die RLC. (7) Die MLCP kann stimuliert werden durch NO, welches von Endothelzellen sezerniert wird und durch die Zellmembran diffundiert. NO aktiviert die Guanylatzyklase (GC), welche GTP in cGMP umwandelt. (8) cGMP aktiviert die cGMP-abhängige Proteinkinase (Proteinkinase G, PKG), welche MLCP aktiviert und damit eine Relaxation der glatten Muskelzelle fördert.

Glatten Muskulatur befindet sich im gesamten Körper verteilt und erfüllt je nach Organ unterschiedliche Aufgaben. Man findet sie beispielsweise im Gastrointestinaltrakt, wo sie für den Nahrungstransport eine zentrale Rolle spielt, sowie in Gefäßwänden, wo sie essenziell zur Blutdruckregulation beiträgt, im urogenitalen System und in den Bronchien der Lunge [49]. Glatten Muskulatur spielt also eine entscheidende Rolle in der Regulation vieler vitaler Funktionen. In Hohlorganen, wie der Gallenblase, ist sie zum Beispiel für die Volumenkontrolle zuständig [96, 136]. Dabei unterscheidet sie sich in ihrem

Aussehen, in ihrer Funktion und im Kontraktionsmechanismus von der quergestreiften Skelettmuskulatur. Sie ist nicht willkürlich ansteuerbar und wird von dem Nervensystem über Hormone und Neurotransmitter reguliert [36, 36]. Bei glatter Muskulatur handelt es sich um kleine, spindelförmige Zellen, welche nur einen Zellkern enthalten. Glatte Muskelzellen können mehrere 100 μm lang sein bei einem Durchmesser von durchschnittlich 5 – 10 μm [92]. Die glatten Muskelzellen vom kontraktiven Typ enthalten große Mengen an Aktin und Myosin, welche die wichtigsten Proteine für die Kontraktion darstellen und als sogenannte „Minisarkomere“ ungeordnet durch das Zytoplasma verlaufen, wobei sie an den sogenannten Dense Bodies haften und durch diese begrenzt werden (Abbildung 4).

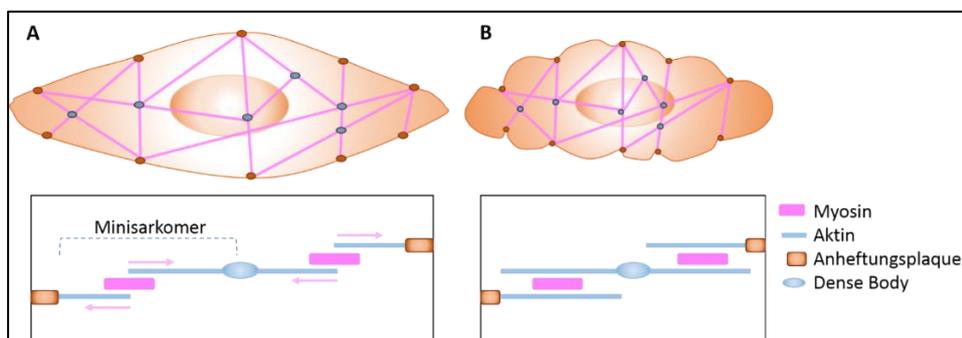


Abbildung 4 Kontraktion der glatten Muskelzelle. (A) Relaxierter Zustand. Aktin- (blau) und Myosinfilamente (rosa) überlappen nur unvollständig. (B) Kontrahierter Zustand. Aktinfilamente sind über Anheftungsplaques (orange) in der Zellmembran verankert, sodass bei Wanderung der Myosinköpfchen entlang des Aktins, was zu einem Ineinanderschieben der Myofilamente führt, die Zelle kontrahiert. (Angelehnt an „Kontraktionsmechanismus der glatten Muskelzelle“ © AMBOSS GmbH, Berlin und Köln, Germany)

Die Dense Bodies besitzen α -Aktinin und verankern als Anheftungsplaques Aktin in der Zellmembran [36, 36, 92]. Durch den ungeordneten, nicht-parallelen Verlauf der Minisarkomere, findet sich in glatten Muskelzellen, im Gegensatz zum Skelettmuskel, keine Querstreifung. In der Zellmembran der glatten Muskelzellen finden sich außerdem Invaginationen, die Caveolae genannt werden und am ehesten den T-Tubuli der Skelettmuskulatur entsprechen. Durch Gap Junctions stehen die Zellen in vielen Organen in funktionellem Kontakt [92]. Den Aktinmonomeren sind Tropomyosinmoleküle angelagert, nicht jedoch Troponin.

Als Kalziumspeicher dient das SR, welches das nötige Kalzium für die Initiierung und Aufrechterhaltung der Kontraktion bereitstellt [97]. Die glatte Muskulatur der Gallenblase befindet sich in der Tunica muscularis [142]. An dem Kontraktionsmechanismus sind viele verschiedene Komponenten beteiligt, von denen die Wichtigsten exemplarisch

genannt werden (Abbildung 3). Die Kontraktion ist in ihrer Stärke und Dauer grundsätzlich abhängig vom Gehalt des intrazellulären Kalziums, kann jedoch durch verschiedene Einflussfaktoren weiterhin moduliert werden [12, 113]. Eingeleitet wird die Kontraktion, wenn es zu einem Anstieg des intrazellulären Kalziums kommt, was über verschiedene Mechanismen passieren kann. Einer dieser Mechanismen ist die Öffnung spannungsabhängiger L-Typ-Kalziumkanäle, im Sinne einer elektromechanischen Kopplung durch depolarisierende Aktionspotentiale. Dadurch strömt extrazelluläres Kalzium in das Innere der Zelle ein [46, 141]. Zusätzlich können über Bindung von Liganden liganden-gesteuerte Kalziumkanäle aktiviert werden. Der Kalziumeinstrom kann über Bindung an Ryanodinrezeptoren des SR zu einem weiteren Anstieg des intrazellulären Kalziums führen (Kalzium-induzierter Kalziumfreisetzung) [24]. Als Liganden können dabei viele verschiedene Hormone, Neurotransmitter, wie beispielsweise ACh, und Pharmaka fungieren im Sinne einer pharmakomechanischen Kopplung. Diese Liganden können ebenfalls an GPCR binden, was einen weiteren Mechanismus zur Erhöhung des intrazellulären Kalziums darstellt. Die G-Proteine führen zu einer Aktivierung der PLC. Die PLC wiederum bildet aus dem Membranlipid PIP_2 die beiden Second Messenger DAG und IP_3 . Das IP_3 bindet an IP_3 -Rezeptoren des SR und induziert eine weitere Freisetzung von Kalzium [140].

In glatten Muskelzellen befinden sich Caldesmon, Calponin und Calmodulin. Caldesmon und Calponin binden an Aktinfilamente und haben dort regulatorische Funktionen, indem sie Myosinbindungsstellen blockieren können [73]. Calmodulin dient in den Zellen als Kalziumsensor und ist im Zytoplasma gelöst. Bei einem Anstieg des intrazellulären Kalziums über 10^{-7} mol/L bindet Calmodulin vier Kalziumionen. Der Kalzium-Calmodulinkomplex kann dann an sein Zielprotein, die MLCK, binden und bildet damit die Grundlage für die Aktivierung des Querbrückenzyklus, welcher im Folgenden noch weiter erläutert wird [123, 135]. Die MLCK phosphoryliert die regulatorische leichte Kette des Myosinkopfes, sodass der Querbrückenzyklus durchlaufen werden kann. Bei Konzentrationen des intrazellulären Kalziums unter 10^{-7} mol/L dissoziieren Kalziumionen und Calmodulin wieder auseinander und aktivieren nicht mehr die MLCK [123]. Die endgültige Unterbrechung des Querbrückenzyklus bewirkt die MLCP, welche die regulatorische leichte Kette wieder dephosphoryliert [4].

Der Ablauf des Querbrückenzyklus ist ein entscheidender Mechanismus für die Muskelkontraktion. Dabei handelt es sich um ein bestimmtes Muster von Wechselwirkungen

zwischen Myosinkopf und Aktinfilament. Notwendig dafür ist die Hydrolyse von ATP. Die dabei freiwerdende Energie wird von dem Myosin in aktive Muskelkraft umgewandelt. Durch Bindung von ATP an die regulatorische leichte Kette des Myosinkopfes (RLC, Abbildung 3) löst sich der Myosinkopf von dem Aktinfilament. ATP wird in ADP und Phosphat gespalten, was ein Umklappen des Hebelarms im Myosin bewirkt, sodass sich die katalytische Domäne verschiebt und auf Höhe eines neuen Aktinmonomers zum Erliegen kommt [36, 36, 140]. Die Affinität des Myosinkopfes zu ADP ist in glatter Muskulatur sehr hoch, sodass die ADP-Abdissoziation verzögert erfolgt und die Umlagerung des Hebelarms im Vergleich zur Skelettmuskulatur größer ist [106]. Durch einen geringen und langsamen ATP-Umsatz ist die glatte Muskulatur in der Lage, bei wenig ATP-Verbrauch hohe Kräfte zu entwickeln und aufrechtzuerhalten, wobei sie dabei sehr langsam ist im Vergleich zu Skelettmuskulatur [92]. Im nächsten Schritt des Querbrückenzyklus geht der umgeklappte Myosinkopf mit dem Aktin eine neue Verbindung mit niedriger Affinität ein, die erst nach Strukturumlagerung im Myosinkopf hochaffin wird. Es erfolgt die Abdissoziation des Phosphats und eine Umorientierung des Hebelarms im Myosin, was zu einer Verschiebung der Aktin- und Myosinfilamente gegeneinander führt. Zu einem weiteren Umklappen kommt es dann durch die Abdissoziation von ADP [106]. Dabei kommt es zu einer weiteren Verschiebung der Filamente gegeneinander. Bei erneuter ATP-Bindung kann der Querbrückenzyklus nun erneut starten [5, 92, 102]. Glatte Muskulatur ist insgesamt durch ihren geringen ATP-Verbrauch gut geeignet für lange Haltefunktionen, was beispielsweise im Kreislaufsystem für die Aufrechterhaltung eines stabilen Blutdrucks erforderlich ist [92].

Durch die entscheidende Rolle der MLCK und MLCP in der Phosphorylierung des Myosins und damit der Kontraktion und Relaxation, sind sie Angriffspunkte zahlreicher modulierender Signalwege. Normalerweise laufen phosphorylierende und dephosphorylierende Prozesse gleichzeitig ab. Eine Modulation der Aktivität der MLCK oder MLCP kann somit bei gleichbleibender intrazellulärer Kalziumkonzentration entscheidende Einflüsse auf die Kontraktion der Muskelzelle ausüben. Es ändert sich dadurch also nicht die Menge, sondern die Empfindlichkeit auf das Kalzium.

Eine Aktivitätssteigerung der MLCP bei gleichbleibendem intrazellulärem Kalzium, führt zu einer vermehrten Dephosphorylierung des Myosins und damit zu einer Desensitivierung der Zelle auf das Kalzium, was zu einer vermehrten Relaxation führt. Eine Aktivitätssteigerung der MLCK führt hingegen zu einer vermehrten Phosphorylierung

des Myosins und damit zu einer Sensitivierung auf das Kalzium, was wiederum zu einer verstärkten Kontraktion und Linksverschiebung der Kraft-Kalzium-Kurve der Zelle führt [82].

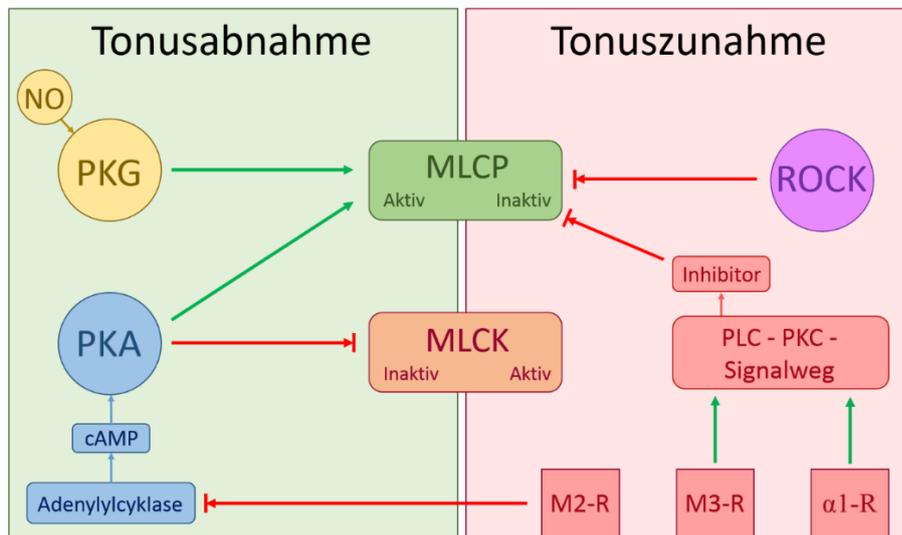


Abbildung 5 Modulierende Faktoren des Tonus der glatten Muskulatur über Änderung der Kalziumsensitivität. Tonusabnahme wird bewirkt durch Aktivitätssteigerung der Myosin-leichte-ketten-Phosphatase (MLCP) und Hemmung der Myosin-leichte-ketten-Kinase (MLCK). Stickstoffmonoxid (NO) aktiviert über Proteinkinase G (PKG) MLCP. Die Adenylylcyklase aktiviert über Adenosinmonophosphat (cAMP) die Proteinkinase A (PKA), welche die MLCP aktiviert und die MLCK hemmt. Tonuszunahme wird bewirkt durch Hemmung der MLCP und Aktivierung der MLCK. Die Rho-Kinase (ROCK) hemmt die MLCP. Über Aktivierung des muskarinischen M2-Rezeptors (M2-R) durch ACh, beispielsweise aus parasympathischen Nervenfasern, wird die Adenylylcyklase gehemmt, welche die MLCK dann nicht mehr hemmen und die MLCP nicht mehr aktivieren kann. Über Aktivierung der M3-Rezeptoren und α 1-Adrenozeptoren (M3-R, α 1-R) wird der Phospholipase C-Phosphokinase C-Signalweg (PLC-PKC-Signalweg) aktiviert. Die PKC aktiviert einen Inhibitor der MLCP.

Grundsätzlich sind an der Modulation von MLCP und MLCK Proteinkinasen beteiligt, welche diese Proteine phosphorylieren können. Ein Faktor, der die MLCP aktiviert und damit eine Tonusabnahme bewirken kann, ist NO. Freigesetzt aus benachbarten Endothelzellen, gelangt es über Diffusion durch die Zellmembran in das Sarkoplasma. Dort aktiviert es die Guanylatzyklase, welche aus GTP cGMP bildet. cGMP aktiviert die PKG, welche daraufhin über Phosphorylierung die MLCP aktiviert (Abbildung 3) [35, 112]. Ein weiteres Beispiel für die Tonusabnahme durch Kalziumdesensitivierung ist der Weg über die PKA, welche cAMP-vermittelt über die Adenylylzyklase aktiviert wird. Die Adenylylzyklase wiederum wird über Bindung von Liganden an β 2-Adrenozeptoren aktiviert. Die aktivierte PKA kann nun über Phosphorylierungsprozesse die MLCP aktivieren und die MLCK hemmen. Das wiederum führt insgesamt zu einer verminderten Phosphorylierung der RLC des Myosins und damit zu einer Relaxation des glatten Muskels bei gleichbleibendem intrazellulären Kalzium [83, 92].

Ein Beispiel für die Tonuszunahme über Kalziumsensitivierung ist die Aktivierung des PLC-PKC-Signalweges. Dieser kann auf verschiedenen Wegen aktiviert werden. Eine Möglichkeit ist die Aktivierung über den Second Messenger DAG [63]. Eine weitere Möglichkeit ist über die Bindung von Liganden an $\alpha 1$ -Adrenozeptoren [28] sowie die cholinerg vermittelte Aktivierung über den M3-Rezeptor [93]. Die aktivierte PKC phosphoryliert einen Inhibitor der MLCP, wodurch diese konsequenterweise gehemmt wird. Eine Hemmung der MLCP kann ebenfalls über den Rho-Kinase-Signalweg erfolgen [1, 34, 60]. In Folge dessen wird die RLC des Myosins vermehrt phosphoryliert und die Kontraktion der glatten Muskelzelle wird gefördert [136]. Auch ACh kann über Stimulation der muskarinischen M2-Rezeptoren den glattmuskulären Tonus erhöhen, indem die Adenylylzyklase gehemmt und deren tonussenkende Wirkung aufgehoben wird [93]. Die Effekte von Caldesmon und Calponin, der sogenannten dünnen Filamente, sind bisher noch nicht abschließend geklärt. Effekte an den Aktinfilamenten werden diskutiert [18, 76].

1.5 Effekte von Bittersubstanzen auf glatte Muskulatur

Es wurde bereits glatte Muskulatur unterschiedlichster Organe auf das Vorhandensein von Bitterrezeptoren und auf ihre Reaktionen auf unterschiedliche Bittersubstanzen hin untersucht. Darunter sind zum Beispiel die glatte Muskulatur der Atemwege, des arteriellen Gefäßsystems und teilweise auch der Gallenblasen vom Meerschweinchen [55, 71, 74, 100]. Man fand TAS2R-mRNA in der glatten Muskulatur der Atemwege [100]. An diesen glatten Muskelzellen konnte man weiterhin sehen, dass TAS2R-Agonisten, wie Saccharin, Chloroquin und Den zu einem PLC β - und IP $_3$ -abhängigen Anstieg des intrazellulären Kalziums führen [27]. Paradoxerweise wird hierdurch jedoch keine Kontraktion, sondern eine Relaxation der isolierten glatten Muskelzellen hervorgerufen, insbesondere dann, wenn die glatten Muskelzellen zuvor einem kontrahierenden Stimulus ausgesetzt wurden [27, 100, 127]. Man führt dies auf eine Hemmung der zuvor durch die bronchokonstriktorisches Agonisten ausgelösten Kalziumoszillationen zurück sowie auf eine Reduktion der Kalziumsensitivität der glatten Muskelzellen. Die Abschwächung der Kalziumoszillationen könnte Folge einer durch Bitterrezeptoragonisten ausgelösten Inhibition der IP $_3$ -induzierten Kalziumfreisetzung sein [127].

Auch in den glatten Muskelzellen arterieller Gefäße können Rezeptoren der Familie TAS2 detektiert werden [71, 74]. Man findet sie unter anderem im Menschen, im Meer-

schweinchen und in der Maus. Es wurden verschiedene Bittersubstanzen an vorkontrahierten glatten Muskelzellen auf ihre Effekte bezüglich Relaxation und Kontraktion sowie auf das Verhalten des intrazellulären Kalziums getestet. Unter diesen Bittersubstanzen waren auch Den, Dextromethorphan (DXM) und Quinin, welche ebenfalls in dieser Arbeit verwendet wurden. In der vaskulären glatten Muskulatur des Menschen führt Den zu einem Anstieg des intrazellulären Kalziums [71]. Bei Nagetieren führte 2013 in einem Experiment von Lund et al. die In-vivo-Gabe von Den zu einem Blutdruckabfall, was als Hinweis auf relaxierende Effekte von Den auf die glatte Muskulatur der Blutgefäße galt [71]. Ein Jahr später wurden von Manson et al. diese starken, epithelunabhängigen, relaxierenden Effekte der Bittersubstanzen auf die glatten Muskelzellen in den Aortae von Meerschweinchen und Mäusen sowie in menschlichen Pulmonalarterien erneut bestätigt [74]. Was weitere Komponenten der Geschmackstransduktionskaskade betrifft, konnte in vaskulären glatten Muskelzellen TRPM5 kaum nachgewiesen werden [29].

Die Gallenblase von Meerschweinchen reagiert, wenn sie zuvor zum Beispiel mit CCK kontrahiert wurde, auf eine Stimulation mit Chloroquin mit einer Relaxation. Dies wird am ehesten ausgelöst durch die Blockade des extrazellulären Kalziumeinstroms und einer Blockade der PKC durch Chloroquin [55].

Im Magenantrum und Duodenum zeigten Jannsen et al. eine konzentrationsabhängige Änderung der Kontraktilität der glatten Muskulatur nach Zugabe von Quinin [47]. Avau et al. fanden weiterhin heraus, dass die glatte Muskulatur des Magens und des Colons sich auf geringe Konzentrationen Den hin kontrahiert und auf höhere Konzentrationen relaxiert [6]. Es wurden verschiedene Inhibitoren der Geschmackstransduktionskaskade angewendet, um eine Beteiligung dieser Komponenten zu überprüfen. Dabei konnte die durch niedrige Konzentrationen Den ausgelöste Kontraktion durch Inhibierung von TAS2R, der PLC β , des IP₃-Rezeptors oder des endoplasmatischen Retikulums inhibiert werden. Die relaxierenden Effekte von Den in höheren Konzentrationen blieben durch Inhibierung dieser Komponenten unbeeinflusst [6].

1.6 Ziel der Arbeit

Das „Schmecken“ von potentiell schädlichen Substanzen ist also keine exklusive Fähigkeit der Zunge. Teile der Geschmackstransduktionskaskade wurden in vielen Organabschnitten des Körpers von Menschen und Tieren entdeckt. Dabei wurden Geschmacksrezeptoren in bestimmten Bereichen glatter Muskulatur nachgewiesen und sowohl

kontrahierende als auch relaxierende Effekte von Bittersubstanzen auf diese entdeckt. Darüber hinaus wurden intrazelluläre Komponenten der Geschmackstransduktionskaskade in Bürstenzellen entdeckt. Es wurden Einflüsse dieser Bürstenzellen auf glatte Muskulatur beschrieben, indem sie als Wächterzellen ACh-vermittelte Reflexe auslösen sollen oder über IL-25 Typ-2-Immunantworten einleiten. In der Gallenblase der Mäuse kommen Bürstenzellen in hoher Dichte vor. Sie sollen das Organ vor schädlichem intestinalem Mikrobiom schützen.

Doch die Frage bleibt offen, inwiefern die Bürstenzellen in der Gallenblase tatsächlich eine Kontraktion beziehungsweise Relaxation der glatten Muskulatur nach Stimulation mit Bitterstoffen initiieren, oder ob die Bitterstoffe nicht möglicherweise auch einen direkten Einfluss auf die Muskulatur ausüben. Um das zu überprüfen, wurden an Gallenblasen verschiedener Mausstämmen Experimente durchgeführt, in denen insbesondere die isolierten glatten Muskelzellen mit Bittersubstanzen stimuliert und die Änderung der Konzentration des intrazellulären Kalziums mittels Fluoreszenzindikatoren und konfokalem Laser-Scanning-Mikroskop gemessen wurde. Die Kalzium-Bildgebung mittels konfokalem Laser-Scanning-Mikroskop ist ein seit den 1950er Jahren stetig weiterentwickeltes Verfahren, mit welchem in Echtzeit Zellen auf Änderungen des intrazellulären Kalziums hin untersucht werden können [10, 111]. Aus diesem Grund wurde diese Messmethode zur Untersuchung der oben genannten Fragestellung ausgewählt. Weiterhin wurden die glatten Muskelzellen mittels genetisch veränderter Mausstämmen sowie mittels Immunhistochemie auf einzelne Elemente der Geschmackskaskade hin untersucht, um einen ursächlichen Zusammenhang zwischen möglichen Reaktionen auf Bittersubstanzen und dem Vorhandensein von Elementen der kanonischen Geschmackstransduktionskaskade zu untersuchen.

2. Material und Methoden

2.1 Allgemein verwendete Materialien und Geräte

Tabelle 1 Allgemein verwendete Geräte

Gerät	Hersteller	Firmensitz
Pipetten (2-1000 µL)	Gilson	Middletom, USA
Direct-Q™ Reinstwasseraufbereitungssystem	Millipore Cor.	Billerica, USA
Magnetrührer RCT Basic und Rührfisch	IKA Labortechnik	Staufen, DE
Analysewaage R200D	Sartorius AG	Göttingen, DE

Waage MXX-612	Denver instruments	NY, USA
Zentrifuge	Heraeus Sepatech	Hanau, DE
Zentrifuge (Centrifuge 5424)	Eppendorf	Wesseling-Berzd., DE
Vortexmischer MS2 Minishaker IKA	IKA Labortechnik	Staufen, DE
pH-Meter Model 410 A	ThermoFisher	Massach, USA
Labotect Inkubator C42	Labotect GmbH	Göttingen, DE

Tabelle 2 Allgemein verwendete Materialien

Material	Hersteller	Firmensitz
Filtertips für Pipetten (0,1-1000 µL)	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen, DE
Reaktionsgefäße (15 mL und 50 mL)	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen, DE
Reaktionsgefäße (0,5 mL, 1 mL, 2 mL)	Eppendorf	Wesseling-Berzdorf, DE
Nitrile white Handschuhe	u.a. B. Braun AG	Melsungen, DE
Parafilm „M“ Laboratory Film	Pechiney Plastic Pack	Chicago, USA
Objekträger	R. Langenbrinck	Emmendingen, DE
SuperFrost Plus Objekträger	R. Langenbrinck	Emmendingen, DE
Deckgläser, rund (25 mm Durchmesser, 0,15 mm Stärke)	R. Langenbrinck	Emmendingen, DE
Messzylinder	Duran Group GmbH	Wertheim, DE
Bechergläser	Duran Group GmbH	Wertheim, DE
Standzylinder	Duran Group GmbH	Wertheim, DE
Standküvetten	Duran Group GmbH	Wertheim, DE
Laborflaschen	Simax/Kavalierglas	Prag, CZ
Multi-Well-Platte, CELLSTAR®	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen, DE
Nunc™ EasYFlask™ 75 cm ² Nunclon™ Delta Surface, Zellkulturflasche	Thermo Fisher Scientific Nunc A/S	Roskilde, DNK

2.2 Verwendete Puffer und Fixative

2.2.1 Tyrode III

Zum Ansetzen des Tyrode III-Puffers wurden alle im Folgenden genannten Substanzen vermischt und mit Aqua dest. auf insgesamt 950 mL aufgefüllt. Anschließend wurde der pH-Wert auf 7,4 eingestellt und mit Aqua dest. auf insgesamt 1000 mL aufgefüllt. Die Lagerung erfolgte bei + 4 °C.

Tabelle 3 Substanzen und Mengenangaben zum Ansetzen des Tyrode III-Puffers

Substanz	Endkonzentration	Hersteller	Firmensitz
Natriumchlorid (NaCl)	130 mM	Carl Roth GmbH und Co. KG	Karlsruhe, DE
HEPES	10 mM	Sigma-Aldrich GmbH	Steinheim, DE

D-Glucose	10 mM	Life technologies Corporation	Grand Island, NY, USA
Kaliumchlorid (KCl)	5 mM	Carl Roth GmbH und Co. KG	Karlsruhe, DE
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	1 mM	Carl Roth GmbH und Co. KG	Karlsruhe, DE
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	8 mM	E. Merck	Darmstadt, DE
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	5 mM	E. Merck	Darmstadt, DE
Natriumpyruvat	10 mM	Fisher Scientific GmbH	Schwerte, DE

Tabelle 4 Stammlösungen für Tyrode III

Substanz	Molekulargewicht (g/mol)	Menge in g auf 100 mL für 1 M-Lösung
Kaliumchlorid (KCl)	74,56	7,4
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	95,22	9,5
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	147,07	14,7
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	84,01	8,4

2.2.2 Phosphatpuffer und Zamboni-Fixativ

Tabelle 5 0,1 M Phosphatpuffer

Substanz	Menge	Hersteller	Firmensitz
Stammlösung A (0,2 M)			
Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (NaHPO ₄ x 2 H ₂ O)	31,2 g	Carl Roth GmbH & Co	Karlsruhe, DE
Aqua dest.	1000 mL		
Lagerung bei + 4 °C			
Stammlösung B (0,2 M)			
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O)	35,6 g	Carl Roth GmbH & Co	Karlsruhe, DE
Aqua dest.	1000 mL		
230 mL Stammlösung A + 770 mL Stammlösung B + 1000 mL Aqua dest. für 0,1 M Phosphatpuffer; pH auf 7,4 einstellen, Lagerung bei Raumtemperatur			

Tabelle 6 Zamboni-Fixativ

Substanz	Menge	Hersteller	Firmensitz
37 %ige Formaldehydlösung (ROTIPURAN® 37%)	50 mL	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, DE
0,2 M Phosphat Puffer (200 mL Lösung A, 300 mL Lösung B, s.o.)	500 mL		
Pikrinsäure (gesättigte Lösung, zweifach gefiltert)	150 mL	Merck Chemicals GmbH	Darmstadt, DE
Im Kühlschrank lagern			

2.2.3 Phosphat-gepufferte-Salzlösung (Phosphate buffered saline, PBS)

Tabelle 7 PBS

Substanz	Menge	Hersteller	Firmensitz
Stammlösung A (Tabelle 5)	28,75 mL		
Stammlösung B (Tabelle 5)	96,20 mL		
Natriumchlorid	22,4 g	Carl Roth GmbH & Co	Karlsruhe, DE
Aqua dest.	Auf 5 L Volumen auffüllen		

pH auf 7,4 einstellen, Lagerung bei Raumtemperatur

2.3 Versuchstiere

Bei den Versuchstieren handelte es sich hauptsächlich um C57BL/6 Mäuse (Zentrale Versuchstierhaltung [ZVTH], Justus-Liebig-Universität Giessen, Stock No. 000664) beider Geschlechter im Alter von 2 bis 9 Monaten mit einem Körpergewicht zwischen 17 und 43 g. Folgende genetisch veränderte Mäusestämme wurden ebenfalls verwendet:

Tabelle 8 Genetisch veränderte Mäusestämme

Stammbezeichnung	Herkunft	Mittleres Alter	Mittleres Gewicht
Tg(Trpm5-EGFP)#Sdmk	Department of Biomedical Sciences, Colorado State University, Fort Collins, CO 80523, USA [22]	7,1 Monate	36,65 g
ChAT-eGFP; B6.Cg-Tg(RP23-268L19-EGFP)2Mik/J; (Stock No. 007902)	M. Kotlikoff (Cornell University), H. Monyer (Universität Heidelberg)	5,6 Monate	25,65 g
B6.129/Trpm5 ^{-/-} Mäuse (Stock No. 005848)	The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA)	9,35 Monate	32,37 g

Alle genetisch veränderten Mausstämmen und ihre korrespondierenden Wildtypen oder heterozygoten Wurfgefährten wurden in Gruppen von 2-6 Individuen unter spezifischen keimfreien Konditionen gehalten. Sie wurden in einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12/12 Stunden gehalten unter Wasser- und Futterzufuhr *ad libitum*. Die Genotypen der Mäuse wurden mittels PCR verifiziert. Die hierfür benötigten Proben stammten von Ohr-Biopsien, entsprechend des veröffentlichten Protokolls des Lieferanten (The Jackson Laboratory). Die C57BL/6 Mäuse waren unter Standardbedingungen bei einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 10/14 Stunden in Makrolonkäfigen und Wasser- und Futterzufuhr *ad libitum* in der zentralen Versuchstierhaltung der Justus-Liebig-Universität in Gießen

untergebracht. Alle Versuche wurden in Übereinstimmung mit den deutschen Tierschutzgesetzen durchgeführt. Diese Studie wurde gemäß den Empfehlungen der Richtlinien der Europäischen Gemeinschaften vom 24. November 1986 (86/ 609/ EEC) durchgeführt. Das Protokoll wurde bei den örtlichen Behörden (Tierschutzbeauftragte der Universität Gießen und dem Tierschutzkomitee, Abt. V54, Regierungspräsidium Gießen, Deutschland; Referenznr. 571_M, 572_M, 793_M, 840_M, 573_M) registriert.

2.4 Organentnahme

Tabelle 9 Materialien zur Organentnahme aus der Maus

Material	Hersteller	Firmensitz
Isofluran	Baxter	Unterschleißheim, DE
Knopfkanüle 2,2 mm	Braun	Melsungen, DE
Federschere	Fine Science Tools GmbH	Heidelberg, DE
Präzisionspinzette	Fine Science Tools GmbH	Heidelberg, DE
Anatomische Pinzette	Fine Science Tools GmbH	Heidelberg, DE
Schere	Fine Science Tools GmbH	Heidelberg, DE

Die Tötung der Tiere erfolgte durch Isoflurannarkose (4 bis 5 %, d.h. 0,2 bis 0,26 mL auf ein 1 L Gefäß; 0,4 bis 0,5 mL auf ein 2 L Gefäß) mit anschließender zervikaler Dislokation unter Betäubung und wurde durch den sofortigen Stillstand der Atmung kontrolliert. Anschließend wurden die Mäuse in Rückenlage mit Knopfkanülen auf einem Styroporbrett fixiert. Kutis und Subkutis wurden mittels einer anatomischen Pinzette und einer Schere eröffnet und die Vena cava inferior wurde durchtrennt, um die Maus ausbluten zu lassen. Zur Freilegung der Gallenblase wurde zusätzlich der Brustkorb eröffnet, um die Leber vom Diaphragma zu trennen, sodass eine bessere Sicht auf die Gallenblase möglich war. Dann wurde die Gallenblase mit der Präzisionspinzette und Federschere von den umliegenden Bandstrukturen befreit und heraus präpariert, um sie dann am Ductus cysticus abzutrennen.

2.5 Kalziummessungen im Organpräparat

2.5.1 Organverarbeitung

Tabelle 10 Substanzen für die Organverarbeitung zur Kalziummessung am Organpräparat

Material	Hersteller	Firmensitz
MEM (Minimum Essential Medium) kein Glutamin, kein Phenolrot	Fisher Scientific GmbH	Schwerte, DE
Penicillin/Streptomycin (P/S)	Fisher Scientific GmbH	Schwerte, DE
Calcium Orange	Fisher Scientific GmbH	Schwerte, DE

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fisher Scientific GmbH	Schwerte, DE
Pluronic acid	Fisher Scientific GmbH	Schwerte, DE
Bromophthalein	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim, DE

Für die Versuche am Organpräparat wurde die Gallenblase nach der Präparation auf eine Glaspetrischale, beschichtet mit Sylgard (Tabelle 4), in MEM (plus 1 % P/S) gelegt. Die Gallenblase wurde mit einer Federschere und einer Präzisionspinzette der Länge nach aufgeschnitten, beginnend am Collum, der Einmündung des Ductus cysticus, hin zum Fundus. Ein Binocular wurde dabei zur Hilfe genommen.

Eine Multiwellplatte wurde mit MEM gefüllt, um dort die Gallenblase hineinzulegen. In einem Inkubator wurde sie bei 37 °C, 5 % CO₂ und 21 % O₂ für etwa drei Stunden gelagert.

Die Calcium-Orange-Lösung wurde folgendermaßen vorbereitet:

Pro Deckgläschen

- 3 µL Calcium Orange (gelöst in DMSO)
- 1 µL Pluronic acid
- 30 µL Bromophthalein
- 266 µL Tyrode III

Die Aufbewahrung erfolgte in Dunkelheit bei 37 °C. Nach verstrichener Inkubationszeit wurde die Gallenblase aus dem MEM herausgenommen, auf ein rundes Deckgläschen gelegt und mit etwa 90 µL Calcium Orange bedeckt. Das Deckgläschen, mitsamt der Gallenblase, wurde in eine feuchte Kammer gelegt und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Das Calcium Orange wurde anschließend wieder entfernt und der Gallenblase wurden 15 Minuten Regenerationszeit in 1 mL Tyrode III (Tabelle 7), ebenfalls bei 37 °C, gegeben.

2.5.2 Vorbereitung für die Kalziummessung am Organpräparat

Nach verstrichener Inkubationszeit wurde die Gallenblase auf dem Deckgläschen ausgebreitet, sodass die Muskelschicht Richtung Objektiv zeigte. Das Deckgläschen wurde dann in eine Halterung eingespannt. Diese war mit einem Schlauchsystem verbunden, das aus einem Zu- und einem Ablauf bestand. Durch den Zulauf erfolgte während der Messung ein kontinuierlicher Fluss mit Tyrode III-Puffer. Der Ablauf sorgte zum einen dafür,

dass das Volumen in der Halterung 2 mL nicht überschritt, zum anderen konnten darüber die Testsubstanzen wieder abfließen.

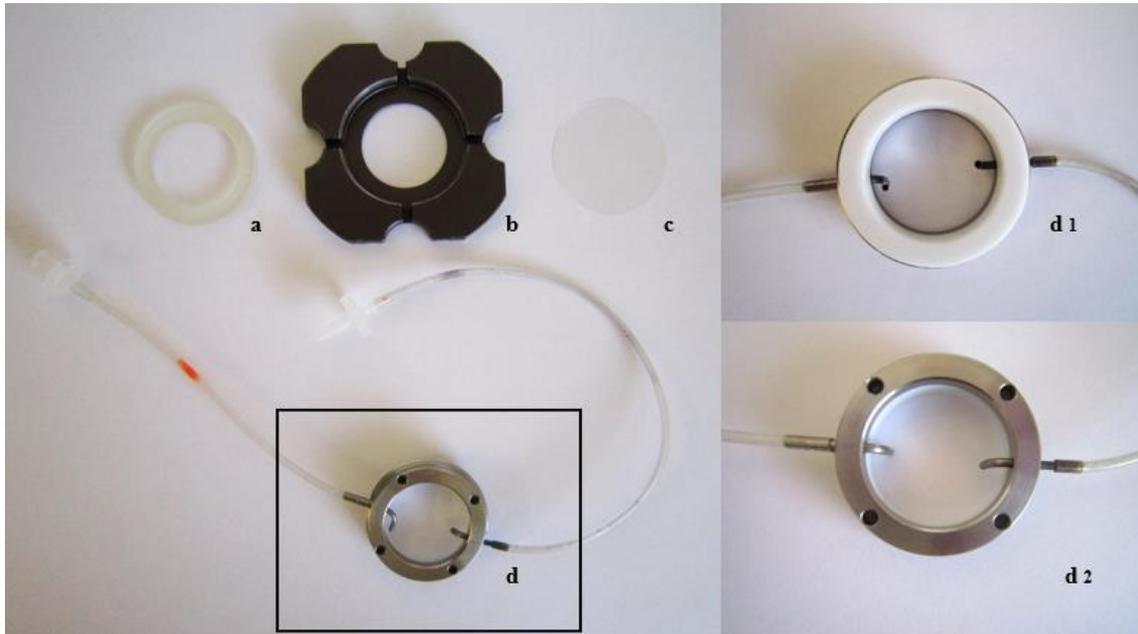


Abbildung 6 Schlauchsystem zum Spülen der Deckgläschen. Zu sehen ist die (b) Deckgläschenhalterung, auf die das (c) Deckglas aufgelegt und mit einem (a) Kunststoffring abgedichtet wird. Das System wird mit einem (d) Metallring verschraubt, an dem sich auch der Zu- und Ablauf befindet. (d1) Unterseite. (d2) Oberseite.

Damit sich die Gallenblase während der Messung nicht bewegt oder wegschwimmt, musste sie auf dem Deckglas fixiert werden. Dafür wurden verschiedene Methoden ausprobiert. Zunächst wurde versucht, die Gallenblase mit einem passend zurecht geschnittenen Stück Modellierwachs (Pluradent AG & Co KG, Offenbar, DE) zu beschweren. Das Wachs war allerdings zu leicht (61 mg), sodass es nach Zugabe der Testsubstanzen wegschwamm. Zusätzlich wurde versucht, die Gallenblase mit dünnen Nadeln an dem Wachs zu fixieren, was sich aufgrund der geringen Größe der Gallenblase als nicht praktikabel erwies. Ähnliches wurde auch mit einem passend zurechtgeschnittenen Stück Sylgard versucht, was mit 913 mg zwar schwerer war als das Wachs, jedoch immer noch zu leicht. Die Gallenblase bewegte sich stark unter der laufenden Spülung. Als beste Variante stellte sich ein dünnes, engmaschiges Netz heraus, das außen mit einem Metallring beschwert war. Dieses wurde einfach mittig auf die Gallenblase gelegt und war schwer genug (1,3 g), dass es nicht wegschwamm. Anschließend wurde das Deckglas in der Halterung in das konfokale Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM – Confocal Laser Scanning Microscope (LSM 710 mit ZEN 2010 B SP1), Carl Zeiss, Wetzlar, DE) eingespannt. Durch eine integrierte Inkubations-

kammer, wurde die Halterung mit dem Deckgläschen auf 37 °C erwärmt. Der Tyrode III-Puffer wurde während der Messungen in einem Wasserbad ebenfalls auf 37 °C erwärmt.

Bevor Testsubstanzen hinzugegeben wurden, wurde die Gallenblase 15 Minuten mit 20 µL einer 10 µM-Lösung aus dem Rho-Kinase-Inhibitor Y-27632 (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, DE) inkubiert, um eventuelle Kontraktionen der glatten Muskelzellen, die durch die Testsubstanzen verursacht werden, zu inhibieren. Die Kontraktionen hätten sonst dafür gesorgt, dass die markierten Zellen aus der Fokuszone geraten und damit wäre die Messung unbrauchbar. Y-27632 beeinflusst als Rho-Kinase-Inhibitor den Kalzium-Signalweg der Zelle nicht, vermindert aber dennoch die Kontraktion [60, 122].

2.6 Kalziummessung mit Zelllinien

2.6.1 Vorbereiten der Deckgläschen

Tabelle 11 Substanzen und Materialien für die Beschichtung der Deckgläschen

Substanz	Hersteller	Firmensitz
Cell-Tak	Fisher Scientific GmbH	Schwerte, DE
2 M Natriumkarbonat	E. Merck	Darmstadt, DE
2-Propanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim, DE
UV-Betrachter	CAMAG	Berlin, DE

Damit die isolierten Zellen später auch am Deckgläschen haften blieben, mussten diese zuvor beschichtet werden. Pro Deckgläschen wurden dafür 3 µL Cell-Tak, 12 µL 2 M Natriumkarbonat und 0,45 µL 2-Propanol in ein Reagenzgefäß gegeben und mit einem Vortex vermischt. Auf jedes Deckgläschen wurden je 10 µL der Beschichtungslösung gegeben und mit einer umgeknickten Pipettenspitze verteilt. Der Rand des Deckgläschens blieb dabei wenige Millimeter frei. Als nächstes wurden die Deckgläschen bei 37 °C in einem Wärmeschrank getrocknet. Dadurch entstand auf ihnen eine weiße Schicht. Diese weiße Schicht wurde vorsichtig mit sterilem Wasser abgespült. Danach kamen die Deckgläschen erneut zum Trocknen in den Wärmeschrank. Wenn danach noch immer weiße Rückstände zu sehen waren, wurde erneut mit sterilem Wasser gewaschen und die Deckgläschen daraufhin wieder im Wärmeschrank getrocknet. Wenn die Deckgläschen von allen weißen Rückständen befreit waren, waren sie bereit, mit Zellen beladen zu werden. Die Aufbewahrung der Deckgläschen erfolgte bis zu 24 h im Kühlschrank. Wenn die beladenen Deckgläschen über einen längeren Zeitraum inkubiert werden sollten, wurden sie vorher für 2-3 Stunden unter einer UV-Lampe bei 254 nm desinfiziert.

2.6.2 Reporterzellen

Tabelle 12 Substanzen für das Anlegen einer Zellkultur für Kalziummessung an isolierten Zellen

Substanz	Hersteller	Firmensitz
Ham's F-12K (Kaighn's) Medium	Fisher Scientific GmbH	Schwerte, DE
Fluo-4	Fisher Scientific GmbH	Schwerte, DE
Fetal Calf Serum (FCS), Gibco™	Fisher Scientific GmbH	Schwerte, DE
Trypsin-EDTA-Lösung (0,5 g/L HBSS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim, DE
Muskarin (Mus)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim, DE
Acetylcholin (ACh)	Sigma-Aldrich GmbH	Steinheim, DE

Um die Praktikabilität des Fluoreszenzfarbstoffes Calcium Orange für das Experiment zu testen, wurden Kalziummessungen an einer M3WT4-Zelllinie (ATCC® CRL-1981™) durchgeführt. Die M3WT4-Zellen exprimieren den muskarinischen Acetylcholinrezeptor m3 mit einer Dichte von 60-800 fmol an Rezeptoren pro mg an Membranproteinen [15]. Daher ist bei Kalziummessungen nach Zugabe von Mus oder ACh ein starker Anstieg des intrazellulären Kalziums zu erwarten. Es wurden Zellen auf insgesamt vier Deckgläschen angesetzt. Die Zellen auf zwei der Deckgläschen wurden mit Calcium Orange und die Zellen der anderen beiden Deckgläschen mit Fluo4 beladen. Verglichen wurden die Farbstoffe anhand der Intensitätsveränderungen innerhalb der Zellen nach Zugabe der Testsubstanzen.

Fluo-4 wurde folgendermaßen angesetzt:

Pro Deckgläschen

- Fluo-4 (in DMSO) 2 µL
- Bromophthalein 30 µL
- Pluronic acid 1 µL
- Tyrode III 266 µL

Die Aufbewahrung erfolgte in Dunkelheit bei 37 °C.

Die Zelllinie wurde in einem Stickstoffbehälter aufbewahrt. Nach Entnahme wurden die Zellen für 10 min in Ham's F-12K Medium (mit 10% FCS und 1% P/S) gewaschen. Anschließend wurden sie für 5 min bei 115 G zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde noch einmal wiederholt. Danach wurden die Zellen in eine Zellkulturflasche umgefüllt und mit etwa 30 mL Medium bedeckt. Das Gefäß mit den Zellen wurde dann bei 37°C und 5 % CO₂ in einen Inkubator gestellt. Es erfolgte eine tägliche Kontrolle der Zellen unter einem

Mikroskop. Alle 48 h wurde das Medium erneuert. Nachdem die Zellen sich ausreichend vermehrt hatten, wurde das Medium entfernt. Die Zellen wurden zunächst in PBS gewaschen. Anschließend wurden 2 mL Trypsin hinzugegeben und es erfolgte eine Inkubation bei 37°C für 5 min. Danach wurde die Zellkulturflasche leicht geschüttelt, um die Zellen mechanisch vom Boden des Gefäßes zu lösen. Es erfolgte eine Zugabe von FCS, um das Trypsin zu deaktivieren.

Die Zellen wurden entnommen und in ein 15 mL-Reaktionsgefäß umgefüllt. In diesem wurden sie für 5 min bei 115 G zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und 1 mL Medium wurde hinzugefügt. Einige Zellen wurden mit einer Pipette entnommen und auf zwei beschichtetes Deckgläschen verteilt. Auf diese wurden zusätzlich jeweils 300-400 µL Medium gegeben. Die Deckgläschen wurden für etwa 30 min bei 37°C in einen Inkubator gestellt, um den Zellen Zeit zu geben sich abzusetzen. Anschließend wurde das Medium vorsichtig abpipettiert und durch die Fluoreszenzfarbstoffe ersetzt. Auf ein Deckgläschen wurde Calcium Orange gegeben und auf das andere Fluo4.

2.7 Zellisolation

Tabelle 13 Benötigte Substanzen für die Zellisolation

Substanz	Hersteller	Firmensitz
Dispase	Sigma-Aldrich GmbH	Steinheim, DE
Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)	Fisher Scientific GmbH	Schwerte, DE
Delbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Fisher Scientific GmbH	Schwerte, DE

Um Kalziummessungen an isolierten Zellen durchführen zu können, wurde die Gallenblase nach Entnahme zunächst mit einer Federschere eingeschnitten und der Inhalt auf einem Wattetupfer entleert. Anschließend wurde die Gallenblase im Deckel eines Eppendorf-Gefäßes in kleine Stücke geschnitten. Das Gefäß war gefüllt mit einer Mischung aus Dispase und HBSS in einem Verhältnis von 2:1 (mg:mL). Das Gefäß wurde verschlossen und geschüttelt, sodass das Gewebe in der Flüssigkeit schwamm. Es folgte eine Inkubation der Gallenblase für 30 min bei 37 °C im Wasserbad.

Nach dieser Inkubation wurde das Gewebe von dem Eppendorf-Gefäß in ein 15 mL-Reaktionsgefäß überführt und mit einer 1000 µL-Pipette resuspendiert. In diesem Gefäß wurde die Gallenblasen-Dispase-Mischung nun für 5 min bei 64 G zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und auf das Zellpellet wurden erst 1 mL PBS (37 °C), dann 1 mL Trypsin-EDTA-Lösung (37 °C) gegeben. Die Reihenfolge ist hier wichtig, damit

das reine Trypsin die Zellen nicht zerstört. Das Ganze wurde anschließend für 5 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Danach wurde das Gewebe wieder mit einer 1000- oder 100 µL-Pipette resuspendiert und wieder für 5 min bei 64 G zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde mit ca. 1,5 mL PBS gewaschen. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation (5 min, 64 G), der Überstand wurde verworfen und pro enthaltener Gallenblase wurden etwa 800 µL 37 °C warmes DMEM, das zuvor mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin (P/S) vermischt wurde, dazugegeben.

Die Zellmenge aus der Isolation einer Gallenblase reichte für die Vorbereitung von etwa ein bis zwei Deckgläschen, die zuvor mit einer Beschichtungslösung vorbereitet wurden. Auf ein Deckgläschen wurden etwa 400 µL der Zelllösung gegeben. Die Deckgläschen wurden dann in einer Multi-Well-Platte für etwa eine Stunde bei 37 °C, 21 % Sauerstoff und 5 % Kohlenstoffdioxid in den Inkubator gestellt, damit die Zellen ausreichend Zeit hatten, sich abzusetzen und am Deckgläschen zu haften. Die Zellen wurden zum Teil bis zu 72 h im Inkubator belassen, um die Messungen an einem anderen Tag durchzuführen. In diesem Fall wurden die Deckgläschen mit 1-2 mL DMEM bedeckt, um eine ausreichende Nährstoffversorgung der Zellen zu gewährleisten.

2.7.1 Vorbereitung für die Kalziummessungen an isolierten Zellen

Nachdem die Zellen genug Zeit hatten sich auf dem Deckgläschen abzusetzen, wurden die Deckgläschen aus der Multiwellplatte genommen und in eine zuvor vorbereitete feuchte Kammer gelegt. Das verbliebene DMEM wurde vorsichtig abpipettiert. Stattdessen wurden etwa 300 µL Calcium Orange auf die Zellen gegeben, worin sie dann mindestens 10, aber nicht länger als 30 min bei 37 °C inkubiert wurden. Anschließend wurde das Calcium Orange vorsichtig abpipettiert und durch 0,5-1 mL Tyrode III ersetzt.

Da sich in dem Versuch mit der M3WT4-Zelllinie gezeigt hatte, dass sich Fluo4 für diesen Versuch besser eignete, wurde das Calcium Orange in den darauffolgenden Versuchen durch Fluo4 ersetzt. Mit Fluo4 zeigten sich deutlichere Intensitätsveränderungen und weniger Artefakte.

Wenn mehrere Deckgläschen vorbereitet wurden, verweilten die Übrigen in der feuchten Kammer im Wärmeschrank, während an einem Deckgläschen Messungen durchgeführt wurden. Wie auch bei der Messung am Organpräparat wurde das Deckgläschen in der Halterung (Abbildung 6) befestigt und in das CLSM eingespannt.

2.8 Kalziummessung

Tabelle 14 Testsubstanzen und Geräte zur Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration

Substanz	Hersteller	Firmensitz
Cholezystokinin-8 (CCK)	Sigma-Aldrich GmbH	Steinheim, DE
Denatonium (Den)	Sigma-Aldrich GmbH	Steinheim, DE
Dextromethorphan (DXM)	Sigma-Aldrich GmbH	Steinheim, DE
Quinin	Sigma-Aldrich GmbH	Steinheim, DE
Ethanol (100%)	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, DE
Methanol	Sigma-Aldrich GmbH	Steinheim, DE
Confocales Laserscanning Mikroskop (LSM 710 mit ZEN 2010 B SP1) (CLSM)	Carl Zeiss	Wetzlar, DE
Pumpe Ismatec IPC ISM930C	Cole-Parmer GmbH	Wertheim, DE

Nachdem das Deckgläschen in seine Halterung und in das CLSM eingespannt wurde, begann die Messung. Während der gesamten Zeit wurden die Zellen, beziehungsweise das Gallenblasenpräparat, mit Tyrode III über das Schlauchsystem mit 2,5 mL/min gewaschen. Der Tyrode III-Puffer wurde währenddessen in einem Wasserbad auf 37 °C temperiert.

Folgende Laser und Filter wurden verwendet:

- Calcium Orange: Erregung mit DPSS561-10 Laser bei 561 nm; Aufnahme der Emission bei 566-683 nm mit optischen Filtern MBS-558/561
- Fluo-4: Erregung mit Argon-Laser bei 488 nm; Aufnahme der Emission bei 495-553 nm mit optischen Filtern MBS-488/561/633
- Die Intensität wurde auf etwa 100 % eingestellt

Es wurde zunächst am Mikroskop eine geeignete Stelle auf dem Deckgläschen gesucht. Für die Messung am Wholemound-Präparat bedeutete das eine Stelle, an der man möglichst gut die glatte Muskulatur darstellen konnte. Für die Messung an isolierten Zellen war eine hohe Zelldichte mit möglichst wenig aneinanderhängenden Zellen optimal. Mit dem Computerprogramm wurde manuell eine Region of Interest (ROI) festgelegt, an der die Änderung der Fluoreszenzintensität nach Zugabe der Testsubstanzen gemessen wurde. Unter den isolierten Zellen war es rein morphologisch nicht zu unterscheiden, bei welchen es sich um glatte Muskelzellen handelte und welche beispielsweise Epithel- oder Bürstenzellen waren. Daher wurde versucht, zunächst möglichst viele Zellen gleichzeitig zu markieren. Die Detektion glatter Muskelzellen erfolgte mittels der Zugabe von CCK, woraufhin diese eine Fluoreszenzintensitätszunahme von mindestens 10 % zeigten.

Daher wird im Folgenden von CCK⁺-Zellen gesprochen. Alle Zellen, die mit weniger als 10 % Fluoreszenzanstieg auf CCK reagierten, werden im Folgenden als CCK⁻-Zellen zusammengefasst. Während der Messung an isolierten Zellen wurde CCK also als Positivkontrolle für glatte Muskelzellen verwendet. Am Wholemount-Präparat wurde dazu zusätzlich ACh verwendet. Die erste Zugabe von CCK erfolgte zwei Minuten nach Start des Experiments.

Die Testsubstanzen waren DXM und Den am Wholemount-Präparat. An den isolierten Zellen wurde zusätzlich Quinin verwendet. Da sich diese Testsubstanzen nicht, oder nur schlecht, in Wasser lösen, wurden DXM und Quinin zunächst in Ethanol gelöst und dann in sterilem Wasser auf unterschiedliche Konzentrationen verdünnt. Den wurde in Methanol gelöst und dann ebenfalls in sterilem Wasser auf verschiedene Konzentrationen verdünnt. Die Testsubstanzen wurden in zweiminütigen Abständen auf die Zellen pipetiert. Folgende Konzentrationen wurden verwendet:

DXM: 1×10^{-6} M, 1×10^{-5} M, 1×10^{-4} M, 1×10^{-3} M

Quinin: 1×10^{-6} M, 1×10^{-5} M, 1×10^{-4} M

Den: 1×10^{-6} M, 1×10^{-5} M, 1×10^{-4} M, 1×10^{-3} M

Experimente mit entsprechenden Vehikel-Kontrollen wurden ebenfalls durchgeführt:

Ethanol 2×10^{-3} M in sterilem Wasser

Methanol 1×10^{-4} M in sterilem Wasser

2.9 *In silico*-Analyse von scRNA-Seq-Daten zur Expression von CCK- und Bitterrezeptoren in der Gallenblase

Der analysierte Datensatz GSM5888949 stammt aus einer Arbeit von O'Leary et al. über biliäre Bürstenzellen [90]. Hier wurden mittels Sequenzierung von Einzelzell-RNA (single cell RNA sequencing = scRNA-Seq) biliäre Bürstenzellen auf ihren Phänotyp und ihre Funktion hinsichtlich immunmodulatorischer Prozesse im extrahepatischen biliären Trakt hin untersucht. Dieser frei verfügbare Datensatz wurde von Frau Dr. Poharkar, Institut für Anatomie und Zellbiologie, JLU Gießen, in eine Analysesoftware eingepflegt, biasfrei in Zellcluster aufgeteilt und auf der Website https://krupalipoharkar.shinyapps.io/gallbladder_data/ bereitgestellt. Über die dort verfügbaren Analysefunktionen wurden Cluster aus glatten Muskelzellen anhand ihrer

Expression von glattmuskulärem Aktin und Bürstenzellen anhand ihrer Expression von TRPM5 identifiziert und die Expression von CCK- und Bitterrezeptoren über alle Zellcluster hinweg untersucht. Die Ergebnisse wurden als Violinen-Plots und als Heat Map dargestellt.

2.10 Immunhistochemie

2.10.1 Versuchstiere und Gewebeentnahme

Tabelle 15 Substanzen zur Vorbereitung der Gewebe für Immunhistochemie

Substanz	Hersteller	Firmensitz
18 % Saccharose in Phosphatpuffer (Tabelle 5)	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, DE
Phosphatgepuffertes Paraformaldehyd 4 % (PFA)	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, DE

Bei den Versuchstieren handelte es sich um Tg(Trpm5-EGFP)#Sdmk und um C57BL6J Mäuse beider Geschlechter im Alter von 15 bis 32 Wochen mit einem Körpergewicht zwischen 20 und 35 g. Die Haltungsbedingungen, Tötung und Entnahme der Gallenblase waren wie oben beschrieben. Nach der Entnahme wurde die Gallenblase in Zamboni-Fixativ oder 4 % PFA für etwa 24 h abgedunkelt auf einem Schüttler inkubiert.

Außerdem wurden als Positivkontrollen die Zunge und die Trachea entnommen. Die Zunge wurde mit einer Schere so weit aboral wie möglich abgetrennt, um auch die Wallpapille im Präparat zu haben, denn in dieser befinden sich bevorzugt die Geschmacksknospen. Die Zunge wurde nach Entnahme ebenfalls in Zamboni-Fixativ eingelegt und wie auch die Gallenblase für etwa 24 h abgedunkelt auf einem Schüttler inkubiert. Die immunhistochemischen Analysen wurden an insgesamt 16 Präparaten von 10 Mäusen durchgeführt. Nach verstrichener Inkubationszeit wurden die Proben gewaschen. Dafür wurden sie in 0,1 M Phosphatpuffer gelegt und für zwei bis drei Stunden bei Raumtemperatur in Dunkelheit auf einem Schüttler inkubiert. Der Puffer wurde etwa drei bis vier Mal erneuert, bis man davon ausgehen konnte, dass das Fixativ ausgewaschen wurde. Anschließend wurden die Proben für 24 Stunden in 18 %iger Saccharose-Lösung (in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,4) inkubiert (bei Raumtemperatur, Dunkelheit, Schüttler), um einen Gefrierschutz zu gewährleisten.

2.10.2 Paraffinschnitte

Tabelle 16 Substanzen und Materialien für die Anfertigung von Paraffinschnitten

Substanz/Material	Hersteller	Firmensitz
Einbettautomat (Leica TP1020)	Leica Biosystems GmbH	Nussloch, DE
Alkohole für Einbettautomat	VWR Chemicals	Rue Carnot, FRA
Surgipath Paraplast, Paraffin	Leica Biosystems Richmond, Inc.	Richmond, USA
Rotationsmikrotom (Leica RM2255)	Leica Biosystems GmbH	Nussloch, DE
Rotilabo [®] -Einbettkassette, Polyoxymethylen, rosa	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, DE

Um die Proben in Paraffin einzubetten, wurde sie zunächst in einem Filterpapier eingewickelt und anschließend in eine Einbettkassette gelegt. In dieser Kassette wurde das Gewebe anschließend in den Einbettautomaten gelegt. In diesem durchlief es eine aufsteigende Alkoholreihe (Ethanol 70, 80, 95, 100 %, Isopropylalkohol).

Nachdem die Proben im Einbettautomaten die Alkoholreihe durchlaufen hatten, wurden sie entnommen, um in Paraffin eingebettet zu werden. Dieses wurde zuvor bei 60 °C verflüssigt. Die Proben wurden in eine Metall-Ausgießform gelegt und mit flüssigem Paraffin begossen. Damit dieses aushärtete, wurde es auf eine kalte Platte gestellt. Nach Aushärtung wurde der Paraffinblock samt Probe aus der Metallform entfernt und mit dem Rotationsmikrotom zugeschnitten (Schnittdicke 5 µm).

2.10.2.1 Entparaffinieren

Tabelle 17 Substanzen für die Entparaffinierung der Gewebeschnitte

Substanz	Hersteller	Firmensitz
Xylol	VWR Chemicals	Briare, FRA
Ethanol	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, DE
Zitronensäure	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, DE

Damit die Paraffinschnitte mit Antikörpern beladen werden konnten, wurden sie zuvor entparaffiniert. Dafür wurden sie jeweils 5 min in die folgende absteigende Alkoholreihe getaucht: Xylol I, Xylol II, Ethanol 100 %, Ethanol 96 %, Ethanol 70 %

Anschließend wurden die Objektträger kurz in Aqua dest. getaucht und dann zur Antigendemaskierung in 10 mM Zitronensäure gelegt. In dieser wurden die Objektträger in einer Mikrowelle 5 min lang gekocht. Anschließend ließ man das ganze 15 min lang abkühlen.

2.10.3 Gefrierschnitte

Tabelle 18 Substanzen und Materialien für die Anfertigung von Gefrierschnitten

Substanz/Material	Hersteller	Firmensitz
Tissue-Tek-O.C.T. TM -Compound	Sakura Finetek	Alphen aan den Rijn, NLD
Isopentan	Roth GmbH	Karlsruhe, DE
Kryostat Microm HM 560	MICROM International GmbH	Walldorf, DE

Nachdem die Proben 24 Stunden in Saccharose eingelegt wurden, wurden sie in Tissue-Tek auf Filterpapier eingebettet und in schmelzendem Isopentan, das zuvor mit flüssigem Stickstoff gekühlt wurde, eingefroren. Das schnelle Einfrieren verhinderte eine Eiskristallbildung, die unter Umständen Zellverbände im Gewebe hätte zerstören können.

Mit dem Kryostat wurde die nun eingefrorene Gewebeprobe bei -23 °C auf 10 µm Dicke geschnitten und auf Objektträger mit einer positiven Ladung gelegt. Die beladenen Objektträger wurden dann für etwa eine Stunde in Dunkelheit bei Raumtemperatur getrocknet.

2.10.4 Antikörperinkubation

Tabelle 19 Substanzen und Materialien für die Antikörperinkubation

Substanz/Material	Hersteller	Firmensitz
Fettstift PAP Pen Liquid Blocker	Science Services	München, DE
Parafilm	Bemis	Neenah, USA
DAPI (4',6 Diaminidin-2-phenylindol, 1 µg/mL, in PBS)	Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, USA

Tabelle 20 Herstellung von gepuffertem Glycerol

Lösungen	Substanz	Menge
Lösung A	1,5 M Na ₂ CO ₃	250 mL
Lösung B	1,5 M NaHCO ₃	250 mL
Lösung C	Glycerol	500 mL
Lösung B mit Lösung A auf pH 8,6 einstellen		

Tabelle 21 Herstellung von Histoblocklösung

Substanzen	Hersteller	Firmensitz
10 % normales Pferdeserum (NHS)	PAA Laboratories GmbH	Pasching, Österreich
0,5 % Tween 20	Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
0,1 % Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
In PBS, pH = 7,4		

Um die angefertigten Schnitte mit Antikörpern zu beladen, wurden die Schnitte auf dem Objektträger zunächst mit dem Liquid Blocker umrandet. Anschließend wurden die Schnitte für eine Stunde in Histoblocklösung in einer feuchten Kammer inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren und damit unspezifische Markierungen zu reduzieren. Die Primärantikörper wurden in PBS verdünnt. Die Histoblocklösung wurde nach einer Stunde wieder abgesaugt und die Antikörper aufgetragen. Die feuchte Kammer wurde mit Parafilm von außen luftdicht versiegelt. Die Schnitte wurden dann in einer Dunkelkammer bei Raumtemperatur etwa 24 h inkubiert. Die Primärantikörper-Lösung wurde nach verstrichener Inkubationszeit abgesaugt und die Objektträger wurden zwei Mal für 10 min in einer Küvette mit PBS gewaschen. Nach dem Waschen wurde das überschüssige PBS von den Objektträgern abgesaugt. Anschließend wurden sie wieder in die feuchte Kammer gelegt. Die Fluorochrom-markierten Sekundärantikörper, in PBS + S verdünnt, wurden aufgetragen und eine Stunde in Dunkelheit bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Sekundärantikörper-Lösung abgesaugt und die Objektträger wurden zwei Mal für 10 min in PBS gewaschen. Das überschüssige PBS auf den Objektträgern wurde anschließend abgesaugt. Wurde für die Schnitte auf einem Objektträger ein mit Biotin konjugierter Sekundärantikörper verwendet, wurde nun das Cy5-konjugierte Streptavidin als Tertiärreagenz (CyTM Amersham Biosciences Ltd., Little Chalfont, UK), das ebenfalls in PBS verdünnt wurde (1:1600), aufgetragen und erneut in der feuchten Kammer für eine Stunde in Dunkelheit bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden diese Objektträger wieder zwei Mal für 10 min in PBS gewaschen. Nachdem alle Schnitte mit Antikörpern beladen und in PBS gewaschen waren, wurden sie für 10 min abgedunkelt in 4 % PFA (Tabelle 17) fixiert, um die Bindungen zwischen den Primär- und Sekundärantikörpern zu stabilisieren. Anschließend erfolgte wieder ein Waschvorgang in PBS, zwei Mal für 10 min. Das Eindeckeln erfolgte in karbonatgepuffertem Glycerol mit DAPI (1:1.000) zur DNS-Markierung. Die Lagerung der Objektträger erfolgte im Kühlschrank bei 4 °C.

Tabelle 22 Primärantikörper; m = monoklonal, p = polyklonal

Antigen	Wirtspezies	Klon/ Code	Verdünnung	Quelle
Enhanced green fluorescent protein (eGFP)	Huhn, p	NB 100-1614	1:4000	Novus Biologicals, Littleton, CO, USA
Smooth-muscle-actin (SMA)	Maus, m, FITC-konjugiert	1A4	1:1000	Sigma-Aldrich, Steinheim DE

Smooth-muscle-actin (SMA)	Maus, m, Cy3- konjugiert	1A4	1:16.000	Cy TM Amersham Biosciences Ltd., Little Chalfont, UK
Cholin Acetyltransferase (ChAT)	Ziege, p	AB144P	1:250	EMD Millipore Corp., USA, Affiliate of Merck KGaA, Darmstadt, DE
Gα-Gustducin (Synonym GNAT, s.u.)	Kaninchen, p	Sc-395	1:3000	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, DE
Guanine nucleotide- binding protein G(t) subunit alpha-3 (GNAT)	Ziege, p	Pab73402	1:800	Covalab, Cambridge, UK
Phospholipase C beta 2 (PLCβ2)	Kaninchen, p	Sc-206	1:800	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, DE
Transient receptor potential cation channel subfamily M member 5 (TRPM5)	Kaninchen, p	Rb73	1:8000	Chubnov und Gudermann, München, DE [51]

Tabelle 23 Sekundärantikörper

Antigen	Wirtspezies	Konjugat	Ig-Größe	Verdünnung	Quelle
Huhn-IgY	Esel	Cy3	Gesamtes Molekül	1:2000	Dianova, Hamburg, DE
Kaninchen-IgG	Esel	Cy3	Gesamtes Molekül	1:2000	Chemicon, Temecula, CA, USA
Ziegen-IgG	Esel	Cy3	F(ab)2	1:1600	Chemicon, Temecula, CA, USA
Kaninchen-IgG	Esel	Cy5	F(ab)2	1:400	Dianova, Hamburg, DE
Huhn-IgY	Esel	FITC	Gesamtes Molekül	1:800	Dianova, Hamburg, DE
Schaf-/ Ziege-IgG	Esel	Biotin	Gesamtes Molekül	1:400	Dianova, Hamburg, DE

2.10.5 Fluoreszenzmikroskopische Auswertung

Die immunhistochemischen Markierungen wurden mit zwei verschiedenen Fluoreszenzmikroskopen (Tabelle 26) ausgewertet und den Imaging-Programmen AxioVision 4.8.2 (Zeiss, Göttingen, DE) und CellSens Dimension (Olympus, Hamburg, DE) dokumentiert.

Die Bildverarbeitung erfolgte mit dem Programm Image J (National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA). Sie umfasste das Einfügen von Farben in Schwarz-Weiß-Bilder sowie die gleichmäßige Anpassung aller Bildanteile bezüglich Helligkeit und Kontrast.

Tabelle 24 Materialien und Geräte zur fluoreszenzmikroskopischen Auswertung

Material	Hersteller	Firmensitz
Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2 Imaging mot	Carl Zeiss	Göttingen, DE
Fluoreszenzmikroskop Olympus DP73	Olympus	Hamburg, DE

Die Antigene, die in der Gallenblase oder in der Zunge dargestellt werden sollten, wurden teilweise durch synthetische Cyanin-Farbstoffe markiert, die an Sekundärantikörper gebunden waren. Sie haben folgende Anregungs- und Emissionsmaxima:

Cy5: 649/670 nm

Cy3: 550/570 nm

FITC: 492 nm/520 nm

Zur Verstärkung der eGFP-Fluoreszenz in transgenen Mäusen wurden Immunfluoreszenzmarkierungen mit dem Primärantikörper Anti-eGFP vom Huhn und einem Anti-Huhn-IgY-Sekundärantikörper, gekoppelt an Fluoresceinisothiocyanat (FITC), durchgeführt. Die Markierung von Smooth-muscle-actin erfolgte durch primärkonjugierte Antikörper.

Die Auswertung am Epifluoreszenzmikroskop erfolgte mit folgenden Filtern:

Tabelle 25 Fluorochrome

Fluorochrom	Anregungsfilter (nm)	Sperrfilter (nm)	Dichroischer Spiegel (nm)
Cy5	590-650	665-740	655
Cy3	525-560	570-650	555
FITC	460-490	515-550	505
DAPI	360-370	420-460	400

2.10.6 Kontrollen

Zum Ausschluss falsch negativer Ergebnisse und zur Validierung der Antikörper wurden Positivkontrollen angefertigt, die das untersuchte Antigen sicher enthalten. Die Zunge mit angeschnittenen Geschmacksknospen diente dabei als Positivkontrolle für GNAT. Aus vorausgegangenen Experimenten zur Identifikation von Bürstenzellen ist bekannt, dass

die Trachea ebenfalls Bürstenzellen enthält und sowohl TRPM5, PLC β 2, als auch ChAT sicher enthält [58]. Daher wurde sie als Positivkontrolle für die entsprechenden Antikörper verwendet. Zur Spezifitätskontrolle der Sekundärreagenzien wurden während der Antikörperfärbung Gallenblasenschnitte anstatt mit Primärantikörperlösungen nur mit PBS und den in PBS + S gelösten Sekundärantikörpern behandelt.

3. Ergebnisse

3.1 Kalziummessungen am Organpräparat

Die Kalziummessungen wurden zunächst am vollständigen Organpräparat versucht, um die Reaktionen der glatten Muskulatur auf Bittersubstanzen im Zellverbund beobachten zu können. Als Positivkontrollen wurden ACh und CCK verwendet, von denen bekannt ist, dass sie zu einer Kontraktion der Gallenblase und damit verbunden zu einem Anstieg des intrazellulären Kalziums führen [11, 25, 117]. Der Kalziumindikator Calcium Orange würde dann zu einer messbaren Fluoreszenzintensitätsveränderung führen.

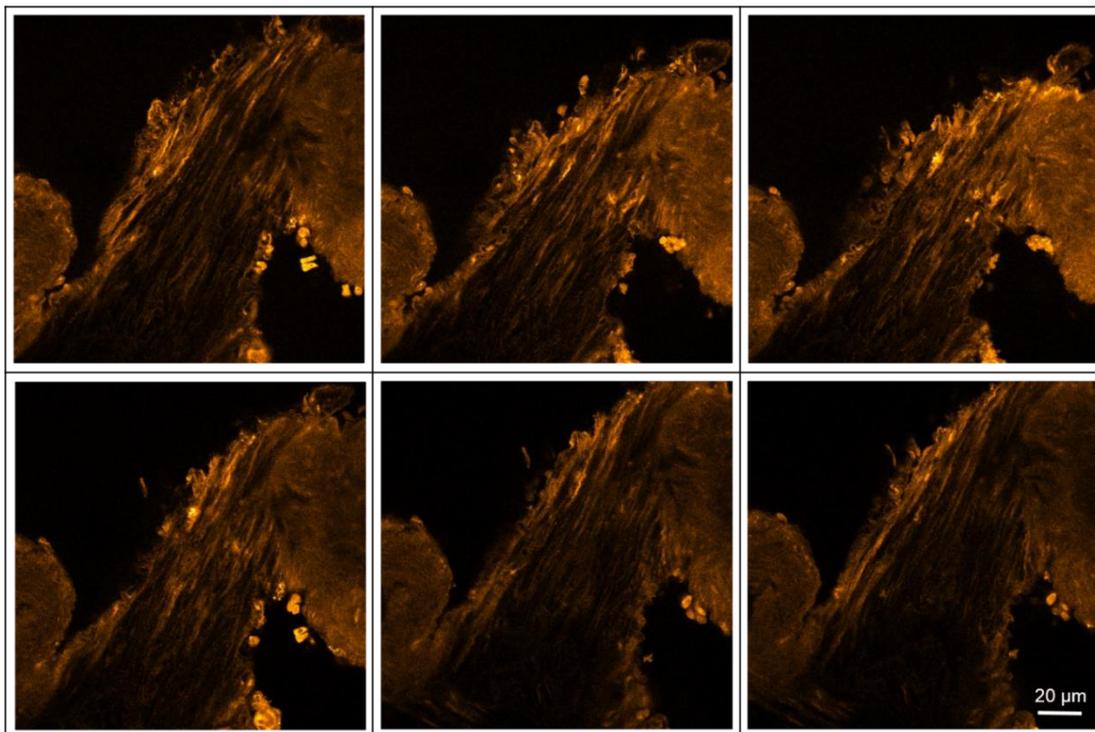


Abbildung 7 Kontraktion und anschließende Relaxation der glatten Muskulatur der Gallenblase einer Maus. Zeitlicher Verlauf der Kontraktion und Relaxation der glatten Muskulatur einer Gallenblase beginnend oben links und endend unten rechts nach Zugabe von ACh und Den. Färbung mittels Fluoreszenzfarbstoff Calcium Orange. Messung mittels CLSM.

Die Region, an der diese Intensitätsveränderungen gemessen werden sollten, ließen sich zuvor mittels Computerprogramm manuell als Region of Interest (ROI) einstellen. Voraussetzung für ein verwertbares Messergebnis war jedoch, dass die markierten Zellen

während der Messung nicht aus der Fokuszone gerieten. Es ergab sich das Problem, dass durch die Kontraktion und Relaxation der Gallenblase die zuvor markierten Zellen aus eben dieser ROI gerieten und die Messungen dadurch unbrauchbar wurden (Abbildung 7). Diesem Problem wurde auf verschiedenen Wegen begegnet. Zunächst wurde versucht die Gallenblase mechanisch zu fixieren. Am besten eignete sich dafür ein Metallring, in den ein engmaschiges Netz eingespannt war. Dieser war zwar schwer genug, um das Wegschwimmen der Gallenblase zu verhindern, jedoch war es dennoch nicht möglich damit die Kontraktion und Relaxation komplett auszuschalten. Um dem weiter entgegenzuwirken, wurde die Gallenblase vor den Messungen in dem Rho-Kinase-Inhibitor Y-27632 inkubiert, welcher selektiv durch Inhibierung der Kalziumsensibilisierung die Kontraktion glatter Muskulatur verhindern sollte [130]. Prinzipiell gibt es verschiedene Wege den Rho-Kinase-Signalweg zu beeinflussen und die damit verbundene zelluläre Antwort zu inhibieren. Y-27632 ist ein synthetisches Pyridin-Derivat und inhibiert die Rho-Kinase über kompetitive Hemmung der ATP-Bindungsstelle, welche für die Aktivität der Kinase essentiell ist [53]. Praktisch zeigte sich durch Zugabe dieser Substanz auf die Gallenblase allerdings maximal eine verminderte Kontraktion der glatten Muskulatur, ganz aufgehoben war diese jedoch nicht. Da sich in weiteren Versuchsreihen die Messungen an isolierten Zellen als erfolgsversprechender zeigten, wurden die Versuche am Organpräparat im Verlauf eingestellt.

3.2 Kalziummessungen an M3WT4-Reporterzellen

Zur Validierung der Fluoreszenzfarbstoffe Calcium Orange und Fluo4 wurden Kalziummessungen an M3WT4-Reporterzellen durchgeführt [72]. Diese besitzen in hoher Dichte muskarinische Acetylcholinrezeptoren, sodass bei Zugabe von ACh oder Mus ein starker Anstieg des intrazellulären Kalziums zu erwarten ist. Dieser Anstieg wurde mithilfe des CLSM gemessen. Die Qualität der Farbstoffe wurde zum einen anhand der Kurvenmorphologie in der Auswertung bestimmt und zum anderen anhand des Aufnahmeverhaltens des Farbstoffes in die Zelle, welches anhand der Leuchtintensität bei Durchsicht durch das Mikroskop abgeschätzt wurde.

3.2.1 Calcium Orange

Es wurden zwei Deckgläschen mit Calcium Orange beladen. Beide Deckgläschen waren dicht mit Zellen besiedelt. Die Zellen haben das Calcium Orange teilweise gut aufgenommen, was mit Hilfe der Fluoreszenzlampe gut an dem kräftig leuchtenden orange zu er-

kennen war (Abbildung 8 D). Viele andere Zellen haben jedoch auch deutlich weniger oder gar nicht geleuchtet. Kalziummessungen wurden insgesamt an 15 Zellen durchgeführt, wobei in der Reihenfolge der Zugabe der Testsubstanzen teilweise variiert wurde. Unabhängig von dieser Reihenfolge zeigte sich jedoch insgesamt bei allen Zellen ein ähnliches Ergebnis. Zu erwarten gewesen wäre ein starker Intensitätsanstieg mit einer kurzen Plateau-Phase und anschließendem Abfall. Praktisch zeigten sich jedoch ein anderes Bild. In einigen Zellen war der Farbstoff so instabil, dass selbst die bloße Lichtstimulation innerhalb der ersten Sekunden der Messung zu einem starken Abfall der Fluoreszenzintensität geführt hat (Abbildung 8 A).

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die mit Calcium Orange beladenen Zellen ein instabiles, artefaktreiches Bild ohne klaren Fluoreszenzanstieg nach Testsubstanzzugabe zeigten bei insgesamt ohnehin schlechter Beladung mit dem Farbstoff.

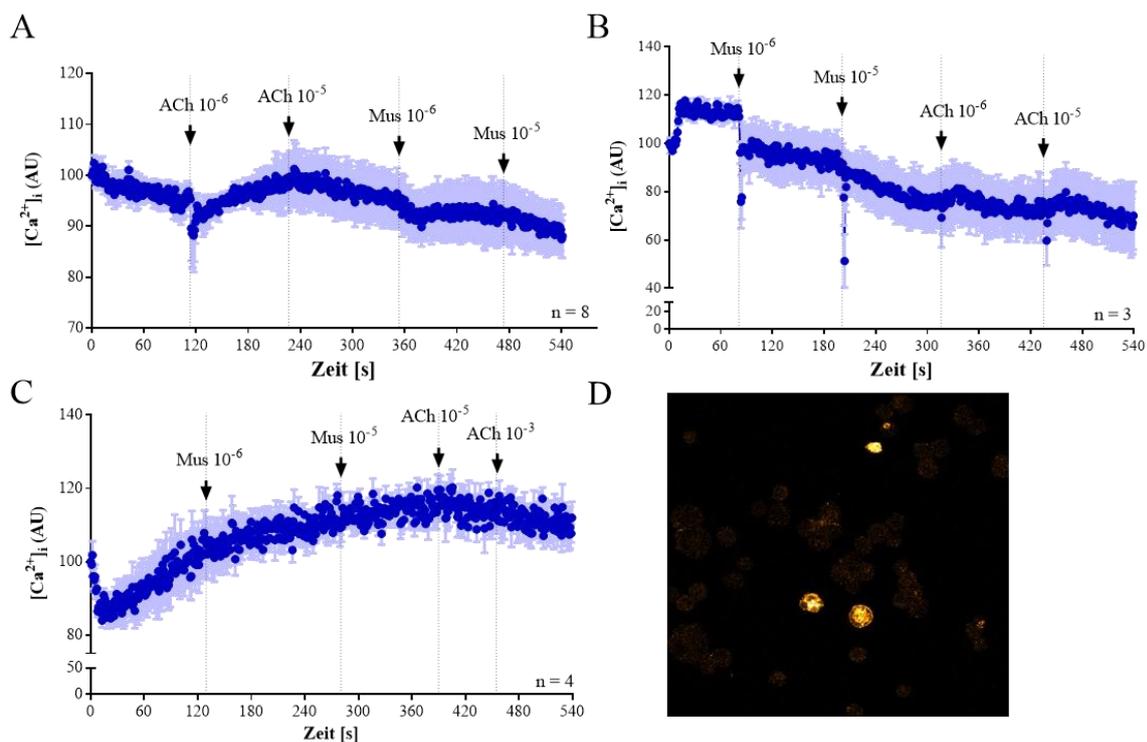


Abbildung 8 (A-C) Änderung der Fluoreszenzintensität der mit Calcium Orange beladenen M3WT4-Reporterzellen nach Zugabe von ACh und Mus. (D) M3WT4 Reporterzellen beladen mit Calcium Orange unter dem Fluoreszenzmikroskop. (A-C) Messung erfolgte mittels CLSM, Angabe der Fluoreszenzintensität in arbiträren Einheiten (AU). Angabe der Konzentrationen in Molarität. Messung unter kontinuierlicher Spülung mit Tyrode-Puffer. Darstellung des Mittelwerts mit Standardfehler. (D) Wenige Zellen sind gut beladen und leuchten kräftig orange.

3.2.2 Fluo4

Es wurden zwei Deckgläschen mit Fluo4 beladen. Beide Deckgläschen waren dicht mit Zellen besiedelt und die Zellen waren gut beladen, was an dem kräftig leuchtenden Grün unter dem Fluoreszenzlicht zu erkennen war (Abbildung 9 A). Bereits nach Start des Experiments, sah man schon einen deutlichen Unterschied zu den mit Calcium Orange beladenen Zellen. Die Fluoreszenzintensität hielt sich in den ersten zwei Minuten ohne Zugabe von Testsubstanzen stabil, während bei den Calcium-Orange-Zellen in dieser Zeit bereits häufig ein Abfall der Intensität zu beobachten war. In zwei-minütigen Abständen wurden die Testsubstanzen ACh und Mus hinzugegeben. Bereits nach wenigen Sekunden gab es einen enormen Fluoreszenzanstieg, teilweise eine Intensitätszunahme über 100 %. Die Messungen wurden insgesamt an acht Zellen durchgeführt (Abbildung 9 B). Insgesamt fielen die Ergebnisse für alle Zellen ähnlich aus. Es kam nach Zugabe der Testsubstanzen zu einem steilen Intensitätsanstieg, gefolgt von einer kurzen Plateau-Phase mit anschließendem Abfall.

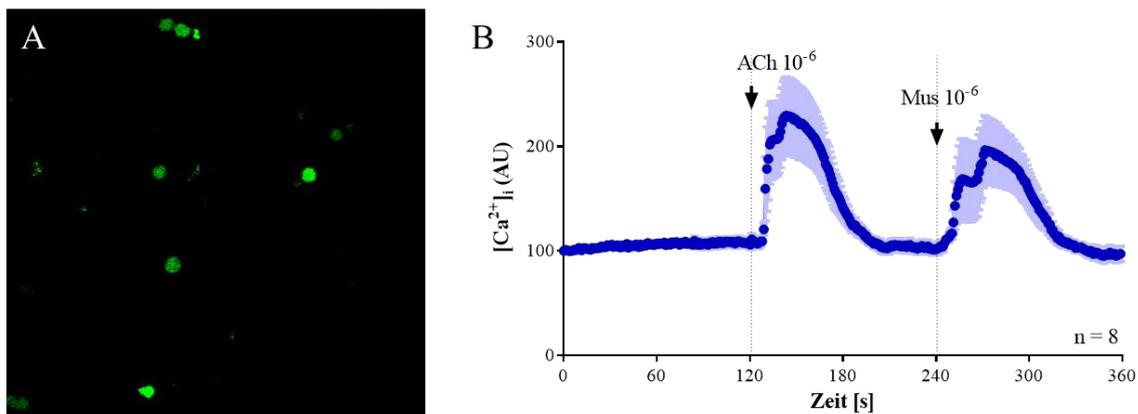


Abbildung 9 (A) M3WT4 Reporterzellen beladen mit Fluo4 unter dem Fluoreszenz-mikroskop. (B) Änderung der Fluoreszenzintensität der mit Fluo4 beladenen M3WT4-Reporterzellen nach Zugabe von ACh und Mus. (A) Fast alle Zellen sind gut mit Fluo4 beladen und leuchten kräftig grün. (B) Messung erfolgte mittels CLSM, Angabe der Fluoreszenzintensität in arbiträren Einheiten (AU). Angabe der Konzentrationen in Molarität. Messung unter kontinuierlicher Spülung mit Tyrode-Puffer. Darstellung des Mittelwerts mit Standardfehler.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die Zellen sich mit Fluo4 deutlich besser beladen ließen als mit Calcium Orange. Auch im Hinblick auf die Stabilität der Farbstoffe, zeigte Fluo4 deutlich bessere Ergebnisse. Zusätzlich zeigte sich im Hinblick auf die Änderungen der Fluoreszenzintensität der mit Calcium Orange beladenen Zellen im Vergleich zu Fluo4 nicht die erwarteten Reaktionen auf die Testsubstanzen. Stattdessen zeigte sich ein artefaktreiches Bild ohne stabile Baseline und wenig aussagekräftige Kurvenverläufe. Aufgrund dieser Messergebnisse wurden die darauffolgenden Kalzium-

messungen an den glatten Muskelzellen der Gallenblase mit Fluo4 anstatt mit Calcium Orange durchgeführt.

3.3 Untersuchung der glatten Muskelzellen der Gallenblase auf das Vorhandensein von CCK- und Bitterrezeptoren

Um die Zellen der Gallenblase auf ihr Vorhandensein von Bitterrezeptoren der Familie TAS2R hin zu untersuchen, wurde ein Datensatz aus Einzelzell-RNA-Sequenzierungen der Gallenblasenzellen von Mäusen analysiert. Insgesamt ergaben sich 14 verschiedene Zellcluster. Zur Überprüfung, welcher Zellcluster den glatten Muskelzellen entspricht, erfolgte eine Untersuchung auf Actin- α -2, welches hauptsächlich in glatter Muskulatur exprimiert wird. Mittels Violinen-Plot konnten somit die Cluster 3 und 5 als glatte Muskelzellen identifiziert werden, wobei der Cluster 3 am ehesten vaskulärer glatter Muskulatur entsprach (Abbildung 10 C). Des Weiteren wurden die Zellen auf die Expression der CCK-Rezeptoren A und B untersucht (Abbildung 10 A und B). Hier zeigte sich für die glatten Muskelzellen des Clusters 5 eine eindeutige Häufung des CCK-A-Rezeptors, was CCK als geeignete Testsubstanz zur Identifikation dieser Zellen herausstellt.

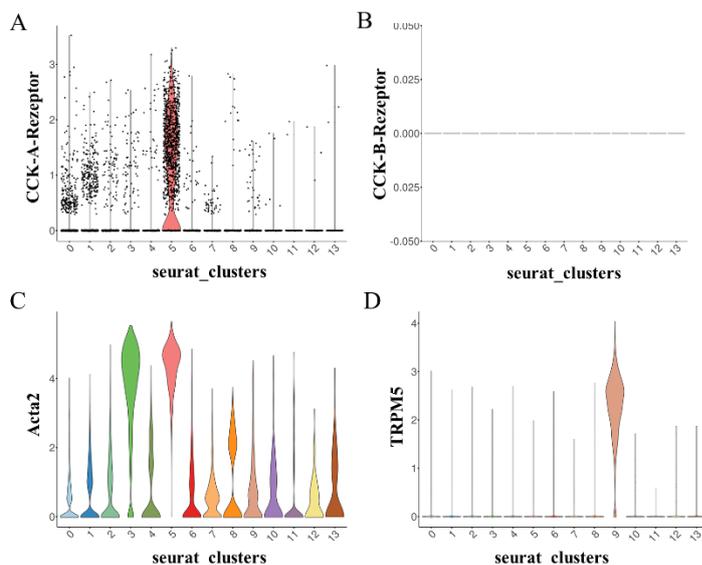


Abbildung 10 Violinen-Plot zur Darstellung der (A) CCK-A-Rezeptor-exprimierenden Zellen, der (B) CCK-B-Rezeptor-exprimierenden Zellen, der (C) Actin- α -2-exprimierenden Zellen und der (D) TRPM5-exprimierenden Zellen der Gallenblase. (A) Expression des CCK-A-Rezeptors insbesondere in Cluster 5. (B) Keine Expression des CCK-B-Rezeptors in der Gallenblase. (C) Cluster 3 und 5 exprimieren Actin- α -2 und entsprechen glatter Muskulatur. (D) Cluster 9 exprimiert TRPM5 und entspricht den Bürstenzellen.

Der CCK-B-Rezeptor hingegen wird in den Zellen der Gallenblase nicht exprimiert (Abbildung 10 B). Cluster 9 erwies sich als das Bürstenzellcluster mit hoher TRPM5-Expression (Abbildung 10 D). Genprodukte der Bitterrezeptoren fanden sich in einzelnen Zellen mit meist stochastischer Verteilung über die Zellcluster. Die TAS2R-Expression beschränkte sich auf insgesamt 6 Familienmitglieder (*Tas2r108*, *Tas2r126*, *Tas2r135*, *Tas2r137*, *Tas2r138*, *Tas2r143*), wobei die absolute Zahl der positiven Zellen sehr gering

war (Abbildung 11). Insbesondere in Cluster 5, der glatten Muskulatur zeigte sich lediglich für TAS2R143 eine einzelne positive Zelle. Ansonsten konnten keine weiteren Bitterrezeptoren in der glatten Muskulatur nachgewiesen werden.

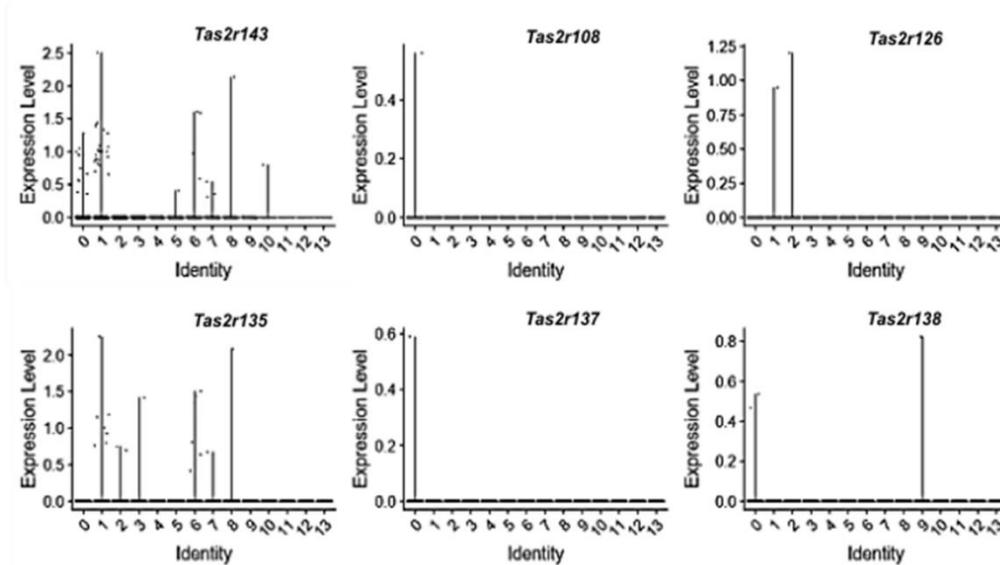


Abbildung 11 Expression von Bitterrezeptoren der Familie TAS2R in Zellen der Gallenblase. (A) Einzelne Treffer in Cluster #0 (Epithelzellcluster, *Epcam1*⁺), #2 (Mesenchymzellcluster 2), #3 (Glatte Muskelzellen Cluster 1, *Acta2*⁺, *CCK-A-R*⁻), #5 (Glatte Muskelzellen Cluster 2, *Acta2*⁺, *CCK-A-R*⁺), #6 (vaskuläres Endothel, *Icam2*⁺, *Cac1*⁺, *Nos3*⁺), #8 (Mesenchymzellcluster 1), #9 (Bürstenzellen) und #10 (lymphatisches Endothel, *Lyvel*⁺)

3.4 Kalziummessungen an isolierten Zellen der Gallenblase

Die Messung der Änderung des intrazellulären Kalziums in glatten Muskelzellen (Zellen mit $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg auf CCK-Gabe) der Gallenblase erfolgte an isolierten Zellen. Als Kalziumindikator wurde Fluo4 verwendet. Die Messungen erfolgten unter ständiger Spülung mit Tyrode-III, sodass das Konzentrationsmaximum der getesteten Bittersubstanz direkt nach Zugabe auf die Zellen zu erwarten war und die Substanz dann langsam ausgespült wurde. Es wurden die Bittersubstanzen Den, Quinin und DXM in unterschiedlichen Konzentrationen getestet. Zur Identifikation der glatten Muskelzellen wurde CCK als Stimulus verwendet.

3.4.1 Test auf Normalverteilung der Kalziumanstiege

Für die statistische Analyse der gewonnenen Daten aus den Kalziummessungen wurde ein Test auf Normalverteilung der Messwerte durchgeführt. Dafür wurden die Kalziumanstiege aller auf CCK reagierenden Zellen verwendet aus den Experimenten mit Den, DXM, Quinin und den Vehikelkontrollen (Abbildung 12).

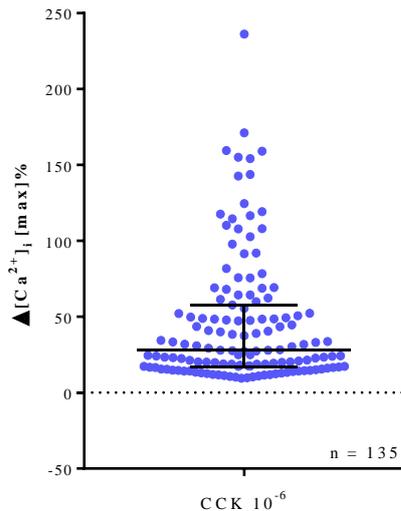


Abbildung 12 Maximale Anstiege der $[Ca^{2+}]_i$ nach Gabe von CCK 10^{-6} M. Messung der Fluoreszenzintensität erfolgte mittels CLSM. Angabe des $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs in Prozent auf der Y-Achse. Darstellung des Medians mit Interquartilsabstand. Statistische Analyse mittels D'Agostino & Pearson omnibus normality Test ($p = < 0,0001$) und des Shapiro-Wilk normality Test ($p = < 0,0001$) ergibt keine Normalverteilung.

Insgesamt ergaben sich dabei 135 Messwerte. Zur statistischen Analyse wurden sowohl der D'Agostino und Pearson omnibus als auch der Shapiro-Wilk Test durchgeführt. Beide Tests ergaben einen p-Wert von kleiner als 0,0001, sodass die Messwerte nicht als normalverteilt betrachtet werden können, was auch den optischen Eindruck bei bildlicher Darstellung der Werte (Abbildung 12) bestätigt. Aufgrund dessen werden in der folgenden statistischen Auswertung der Daten nur nicht-parametrische Testverfahren verwendet.

3.4.2 Messungen des intrazellulären Kalziums nach Gabe von Denatonium

Von insgesamt 7 Mäusen wurden 29 Zellen, die auf CCK reagierten (CCK⁺-Zellen), mit Den in unterschiedlichen Konzentrationen von 1×10^{-6} M bis 1×10^{-3} M stimuliert. Im zeitlichen Verlauf sah man während der Messungen einen stetigen Abfall der Baseline, sodass für die Rechnungen als Ausgangswert stets der Wert unmittelbar vor Substanzgabe angenommen wurde. Es zeigten sich Reaktionen unterschiedlichen Ausmaßes, wobei insgesamt keine klare Dosisabhängigkeit zu erkennen war. Trat eine Reaktion ein, dann geschah dies in der Regel unmittelbar nach Den-Gabe. Im Falle von Den 1×10^{-4} M kam es jedoch erst mit einer leichten Verzögerung zu einem Anstieg (Abbildung 13).

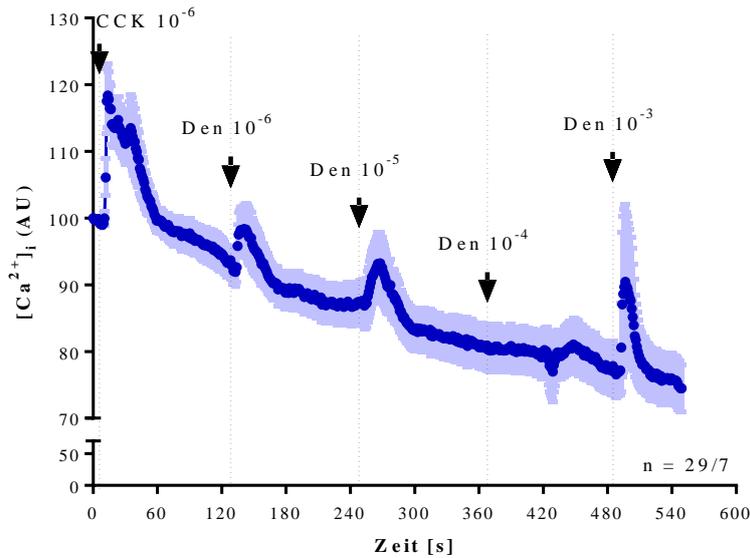


Abbildung 13 $[Ca^{2+}]_i$ der glatten Muskelzellen der Gallenblase nach Zugabe von Den im Zeitverlauf. Messung der Fluoreszenzintensität erfolgte mittels CLSM. $N = 29$ Zellen von 7 Mäusen. Angabe der $[Ca^{2+}]_i$ in arbiträrer Einheit (Arbitrary Units, AU) auf der Y-Achse. X-Achse beschreibt Zeit in Sekunden. Angabe der Konzentrationen in Molarität. Einschlusskriterium für die Zellen war Anstieg des $[Ca^{2+}]_i$ nach CCK um mindestens 10 % des Ausgangswertes. Zugabe von Den erfolgte in zweiminütigen Abständen unter ständiger Spülung mit Tyrode-III, sodass die beabsichtigte Konzentration initial erreicht und die Substanz dann ausgewaschen wurde. Pfeile markieren die Stimulussetzung. Gezeigt werden Mittelwert und Standardfehler.

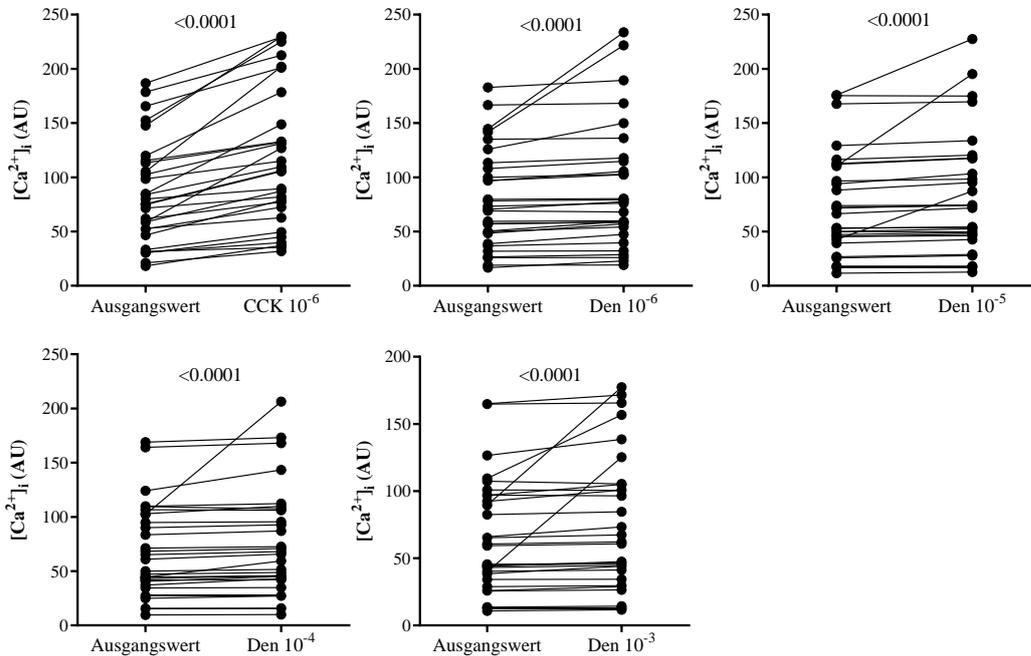


Abbildung 14 $[Ca^{2+}]_i$ vor und nach Stimulation mit CCK oder Den. Messung mittels CLSM. $N = 29$ Zellen von 7 Mäusen. Angabe der $[Ca^{2+}]_i$ in AU. Angabe der Konzentrationen in Molarität. Analyse mit Wilcoxon matched-pairs signed rank Test mit Angabe des p-Wertes.

Zellen, die auf mindestens eine der Den-Konzentrationen mit einem Anstieg des intrazellulären Kalziums von mindestens 10 % im Vergleich zum Ausgangswert

reagierten, werden im Folgenden als Responder bezeichnet. Von allen CCK⁺-Zellen gab es insgesamt 45 % Responder. Es zeigten 24 % aller CCK⁺-Zellen einen Anstieg des intrazellulären Kalziums auf die niedrigste Konzentration Den 1×10^{-6} M über mindestens 10 %. Der Wilcoxon-matched-pairs-signed-rank-Test ergab einen signifikanten Anstieg mit einem p-Wert kleiner als 0,0001 (Abbildung 14). Auf die Konzentration Den 1×10^{-5} M reagierten 10 % der Zellen. Bei noch höheren Konzentrationen mit Den 1×10^{-4} M und Den 1×10^{-3} M war ein Kalziumanstieg über mindestens 10 % bei 17 % und 20 % der Zellen zu beobachten. Auch in diesen Fällen ergaben sich im Wilcoxon-matched-pairs-signed-rank-Test p-Werte kleiner als 0,0001 und damit signifikante Anstiege (Abbildung 14). Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Reaktionsausmaßen von CCK und den unterschiedlichen Den-Konzentrationen untereinander ergaben sich im Friedman-Test lediglich im Vergleich von CCK mit Den. Zwischen den verschiedenen Den-Konzentrationen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 15, Tabelle 26). In der Vehikelkontrolle mit der Maximalkonzentration Methanol 1×10^{-4} M zeigte sich ein Anstieg des intrazellulären Kalziums um etwa 2 % im Median mit einem maximalen Anstieg von 9 %. Im Mann-Whitney-Test zeigte sich im Vergleich der Vehikelkontrolle mit den verschiedenen Konzentrationen Denatonium kein signifikanter Unterschied.

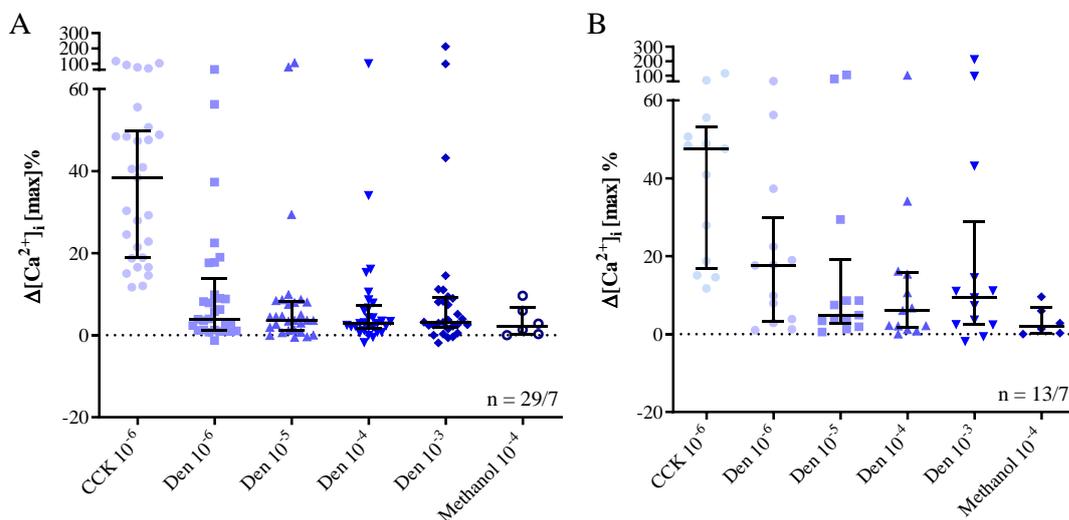


Abbildung 15 Maximale Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ der glatten Muskelzellen der Gallenblase nach Stimulation mit Den. (A) $N = 29$ Zellen von 7 Mäusen für die Experimente mit Den. Maximale Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ nach Stimulusgabe im Verhältnis zum Ausgangswert. Darstellung des Medians mit Interquartilabstand. Angabe der Kalziumänderung in Prozent. Angabe der Konzentrationen in Molarität. (B) Darstellung der Responder. $N = 13$ Zellen von 7 Mäusen.

Tabelle 26 Analyse mit Friedman-Test. Vergleich der Kalziumreaktionen auf unterschiedliche Konzentrationen Den mit der Reaktion auf CCK und der Konzentrationen untereinander. Vergleich der Kalziumreaktionen auf unterschiedliche Konzentrationen Den der Responder untereinander. Vehikelkontrolle mit Maximalkonzentration Methanol aus separatem Experiment mit $n = 6$ Zellen von 2 Mäusen. Statistischer Vergleich von Methanol mit Denatonium in unterschiedlichen Konzentrationen mit Mann-Whitney-Test und Angabe der p-Werte.

	CCK 10^{-6}	Den 10^{-6}	Den 10^{-5}	Den 10^{-4}	Methanol 10^{-4}
Den 10^{-6}	< 0,0001				0,2077
Den 10^{-5}	< 0,0001	> 0,9999			0,4574
Den 10^{-4}	< 0,0001	> 0,9999	> 0,9999		0,4574
Den 10^{-3}	< 0,0001	> 0,9999	> 0,9999	> 0,9999	0,3826
Responder					
Den 10^{-6}	0,1844				0,0216
Den 10^{-5}	0,0081	> 0,9999			0,1451
Den 10^{-4}	0,0020	0,7728	> 0,9999		0,2168
Den 10^{-3}	0,1844	> 0,9999	> 0,9999	> 0,9999	0,1451

Betrachtet man nur lediglich die Responder, ergaben sich im Vergleich zu der Vehikelkontrolle mit Methanol deutlich kleinere p-Werte im Mann-Whitney-Test und sogar ein signifikanter p-Wert von 0,0216 im Vergleich zu den Respondern auf Den 1×10^{-6} M (Abbildung 15, Tabelle 26). Signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Den-Konzentrationen gab es im Friedman-Test auch im Falle der Responder nicht. Sowohl das Reaktionsausmaß auf CCK als auch das auf Den zeigte eine breite Streuung. Das Reaktionsausmaß der Zellen auf CCK variierte zwischen 12 und 116 %. Um zu überprüfen, ob das Reaktionsausmaß auf CCK auch im Zusammenhang mit dem Reaktionsausmaß auf Den steht, wurden die Kalziumanstiege nach Den in Prozent zu CCK berechnet. Ein Anstieg des intrazellulären Kalziums nach Gabe von Den, der prozentual höher war als der nach Gabe von CCK, zeigte sich je nach Konzentration in 3 bis 10 % der Fälle (Abbildung 16 A). Im Friedman-Test zeigten sich für die CCK-relativierten Reaktionsausmaße keine signifikanten Unterschiede zwischen den Konzentrationen. Auch unter den Respondern zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Friedman-Test (Abbildung 16 B).

Um mögliche toxische Effekte des Vehikels auf die Zellen zu prüfen, wurden an 6 Zellen von 2 Mäusen Vehikelkontrollen mit vorheriger und anschließender Gabe von CCK durchgeführt (Abbildung 17). Dabei zeigte sich zwischen der ersten Gabe CCK und der Vehikelgabe (Methanol 1×10^{-4} M) im Dunn's-multiple-comparison-Test ein signifikanter Unterschied der prozentualen Reaktionsausmaße. Im Vergleich zwischen der ersten und zweiten CCK-Gabe zeigte sich kein signifikanter Unterschied (Abbildung 17).

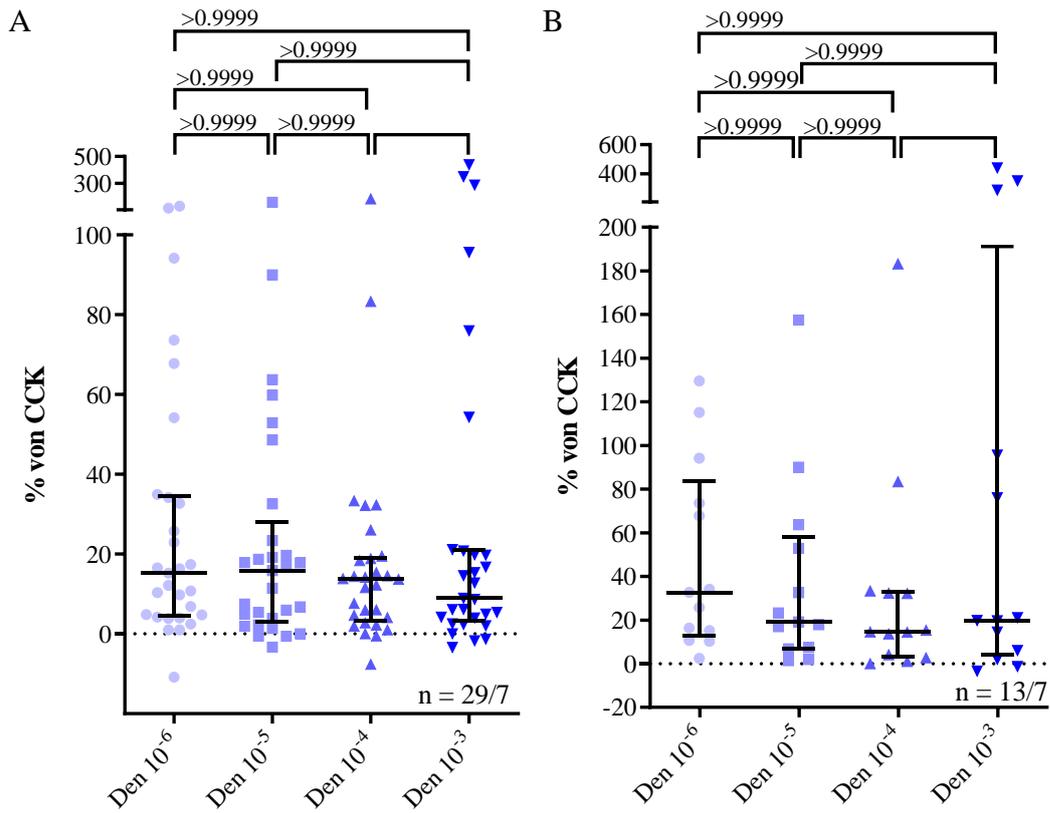


Abbildung 16 Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ der glatten Muskelzellen der Gallenblase nach Stimulation mit Den im Verhältnis zur Antwort auf CCK. Darstellung des Medians mit Interquartilabstand. Maximale Reaktion auf Den in Prozent der maximalen Reaktion auf CCK. Analyse mit Friedman-Test mit Angabe der p-Werte. (A) $N = 29$ Zellen von 7 Mäusen. (B) Darstellung der Responder. $N = 13/7$ Zellen.

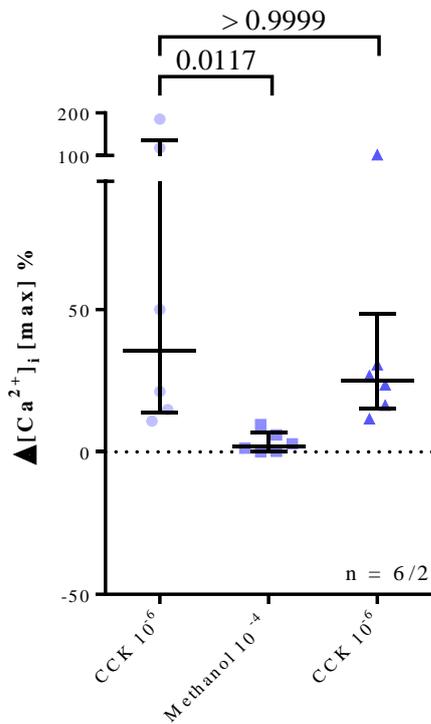


Abbildung 17 Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ nach Vehikelkontrolle für Den mit Methanol $10^{-4} M$ und anschließender CCK-Kontrolle. Effekt von CCK auf die glatte Muskelzelle vor und nach Vehikelgabe. $N = 6$ Zellen von 2 Mäusen. Messung mittels CLSM. Angabe der maximalen Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ in Prozent. Gezeigt werden Median mit Interquartilabstand. Analyse mittels Dunn's-multiple-comparisons-Test unter Angabe der p-Werte.

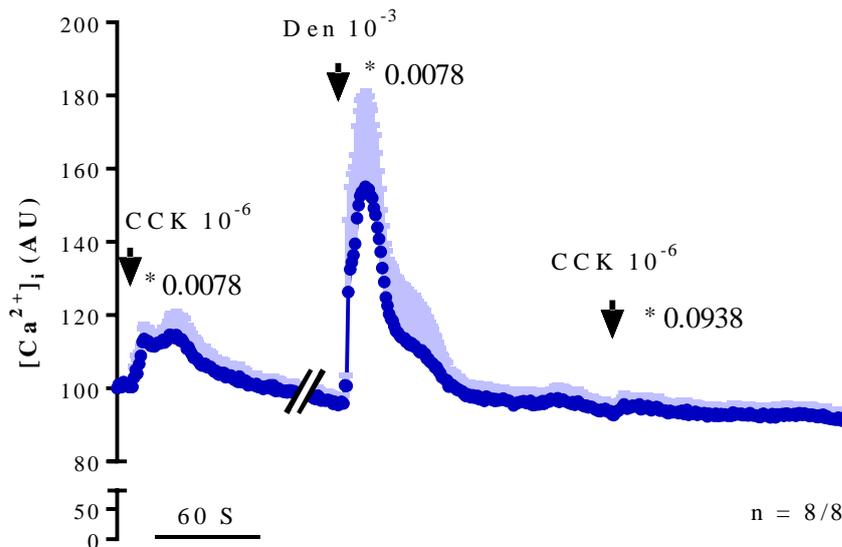


Abbildung 18 $[Ca^{2+}]_i$ der CCK⁺-Zellen der Gallenblase einer Maus nach direkter Stimulation mit der Maximalkonzentration Den im Zeitverlauf. Messung der Fluoreszenzintensität mittels CLSM. $N = 8$ Zellen von 8 Mäusen. Angabe der $[Ca^{2+}]_i$ in AU auf der Y-Achse. Angabe der Konzentrationen in Molarität. Pfeile markieren die Stimulussetzung. Gezeigt werden Mittelwert und Standardfehler. Analyse der Kalziumanstiege mittels Wilcoxon-matched-pairs-signed-rank-Test unter Angabe der (*) p-Werte.

Insgesamt schien der Kalziumanstieg der Zellen bei niedrigeren Konzentrationen Den stärker ausgeprägt zu sein als bei hohen. Um zu überprüfen, ob dieser geringere Anstieg auf eine mögliche Desensitivierung der Zellen auf die Testsubstanz zurückzuführen war, wurden weitere Versuchsreihen an 8 Zellen von 8 Mäusen durchgeführt, bei denen die CCK⁺-Zellen sofort mit der Maximalkonzentration Den 1×10^{-3} M stimuliert wurden ohne vorherige Gabe der Konzentrationsreihe. Dabei zeigte sich ein Kalziumanstieg über mindestens 10 % in 75 % der Zellen. Der Wilcoxon-matched-pairs-signed-rank-Test ergab dabei einen signifikanten Anstieg des intrazellulären Kalziums im Vergleich zum Ausgangswert (Abbildung 18). Der statistische Vergleich zwischen den Reaktionsausmaßen von CCK und Den 1×10^{-3} M in dieser Versuchsreihe mittels Wilcoxon matched-pairs signed rank Test ergab keinen signifikanten Unterschied (Abbildung 19 A). Verglichen mit dem Anstieg des intrazellulären Kalziums nach Stimulation mit Den 1×10^{-3} M nach vorheriger Gabe der Konzentrationsreihe ergab sich zur direkten Stimulation mit der Maximaldosis Den ein signifikanter Unterschied im Mann-Whitney-Test (Abbildung 19 B).

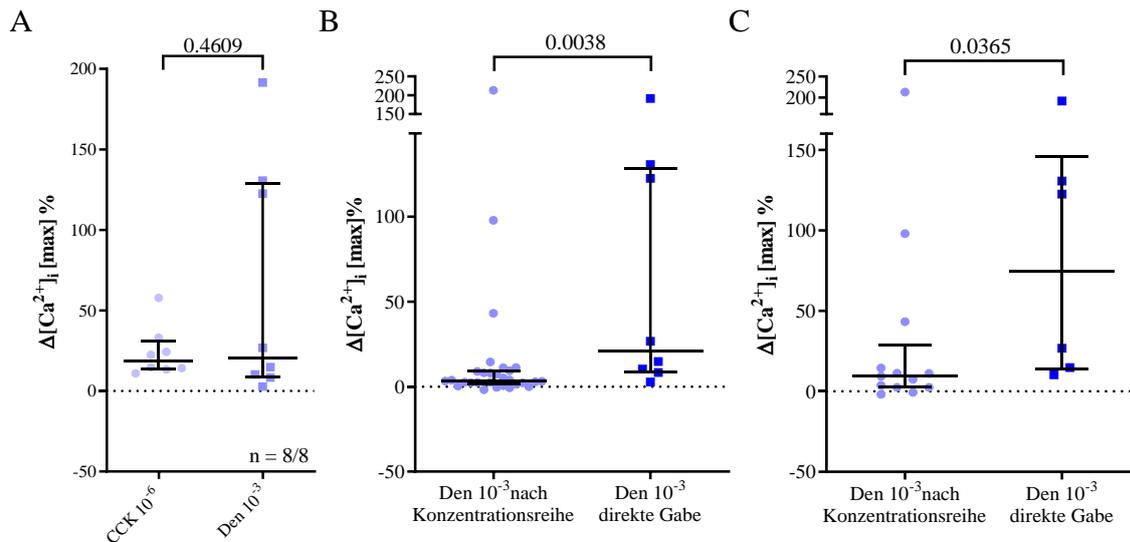


Abbildung 19 Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ nach (A) direkter Stimulation mit der Maximalkonzentration Den und (B) Vergleich der Änderungen der $[Ca^{2+}]_i$ zwischen Gabe der Maximalkonzentration Den nach der Konzentrationsreihe und direkter Gabe. (C) Nur Darstellung der Responder. Messung der Fluoreszenzintensität mittels CLSM. Angabe der Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ in Prozent auf der Y-Achse. Angabe der Konzentrationen in Molarität. Gezeigt werden Median und Interquartilabstand. (A) $N = 8$ Zellen von 8 Mäusen. Analyse mittels Wilcoxon matched-pairs signed rank Test und Angabe des p-Wertes. (B) Analyse mittels Mann-Whitney-Test und Angabe des p-Wertes. (C) Analyse mittels Mann-Whitney-Test und Angabe des p-Wertes.

Während die Zellen nach der Konzentrationsreihe im Median mit einem Kalziumanstieg von 3,2 % reagierten, kam es nach direkter Gabe mit einem Kalziumanstieg von etwa 21 % im Median zu einem gut sieben Mal höheren Anstieg. Interessanterweise kam es jedoch nach der Konzentrationsreihe zu höheren Maximalwerten von bis zu 213 %, verglichen mit 191 % nach direkter Gabe. Vergleich man lediglich die Responder miteinander (Abbildung 19 C), zeigte sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied im Mann-Whitney-Test. Das Reaktionsausmaß der Responder lag im Median sogar bei 74 %, damit jedoch ebenfalls etwa sieben Mal höher als das Reaktionsausmaß der Responder nach Konzentrationsreihe, welches bei etwa 10 % lag. Zusammenfassend gesagt war also der Effekt auf die Zellen nach direkter Stimulation mit der Maximaldosis Den signifikant größer als nach Stimulation mit der Maximaldosis nach vorheriger Gabe der Konzentrationsreihe.

Um zu testen, ob der Anstieg des intrazellulären Kalziums nach Stimulation mit Den ein muskelzellspezifischer Effekt ist, wurden auch CCK-Zellen, also mutmaßlich nicht-glatte Muskelzellen, hinsichtlich ihrer Reaktionen auf Den hin untersucht (Abbildung 20). Insgesamt wurden 35 Zellen von 6 Mäusen untersucht.

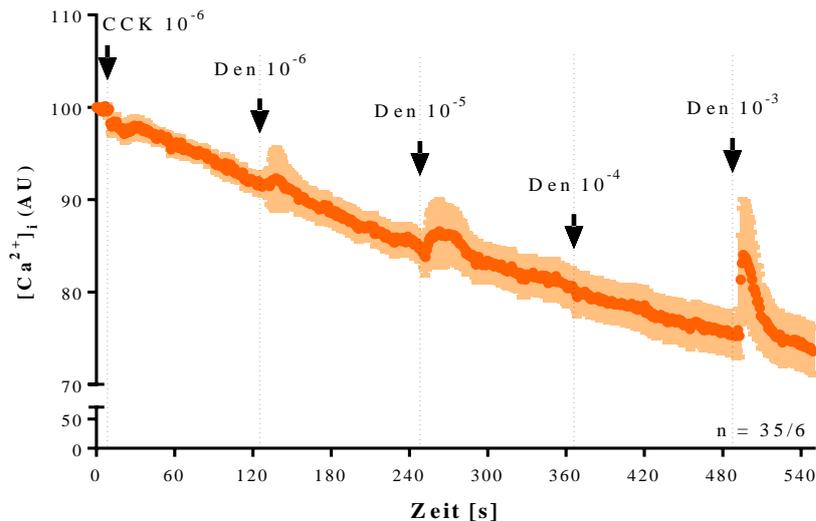


Abbildung 20 $[Ca^{2+}]_i$ nach Stimulation von CCK^- Zellen mit Den im Zeitverlauf. Messung der Fluoreszenzintensität erfolgte mittels CLSM. $N = 35$ Zellen von 6 Mäusen. Angabe der $[Ca^{2+}]_i$ in AU auf der Y-Achse. X-Achse beschreibt Zeit in Sekunden. Angabe der Konzentrationen in Molarität. Einschlusskriterium für die Zellen war ein fehlender Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ nach CCK-Gabe ($< 10\%$). Zugabe von Den erfolgte in zweiminütigen Abständen unter ständiger Spülung mit Tyrode-III, sodass die beabsichtigte Konzentration initial erreicht und die Substanz dann ausgewaschen wurde. Pfeile markieren die Stimulussetzung. Gezeigt werden Mittelwert und Standardfehler.

Wie auch bei den glatten Muskelzellen zeigte sich während der Messung ein kontinuierlicher Abfall der Baseline. Auch bei den CCK^- -Zellen zeigte sich keine klare Dosisabhängigkeit. Im Wilcoxon-matched-pairs-signed-rank-Test zeigte sich für alle Konzentrationen ein signifikanter Anstieg nach Gabe von Den (Abbildung 21). Unter den CCK^- -Zellen wurden insgesamt 28 % als Responder identifiziert. Auf die Konzentration $Den\ 1 \times 10^{-6}\ M$ haben 11 % der CCK^- -Zellen mit mindestens 10 % Kalziumanstieg reagiert. Das entsprach etwa der Hälfte der Responder der CCK^+ -Zellen. Auch auf alle weiteren Den-Konzentrationen reagierten die CCK^- -Zellen etwas weniger. Der Unterschied war auf die höheren Konzentrationen mit 4 bis 6 % jedoch etwas geringer. Auf die Konzentration $Den\ 1 \times 10^{-5}\ M$ haben lediglich 6 % der CCK^- -Zellen reagiert. Auf die Konzentration $Den\ 1 \times 10^{-4}\ M$ reagierten ebenfalls 11 % und auf die Konzentration $Den\ 1 \times 10^{-3}\ M$ reagierten 14 % der CCK^- -Zellen mit einem Kalziumanstieg von mindestens 10 % (Abbildung 22). Im Chi-square-Test ergab sich für keine der Den-Konzentrationen ein signifikanter Unterschied zwischen der Anzahl der Responder der CCK^- - und CCK^+ -Zellen.

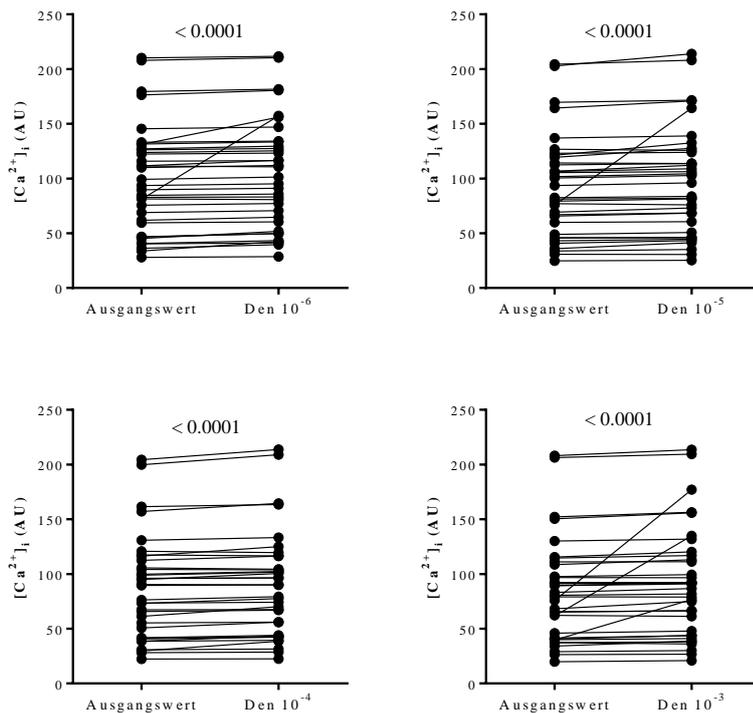


Abbildung 21 $[Ca^{2+}]_i$ vor und nach Stimulation mit Den in CCK⁻-Zellen der Gallenblase von Mäusen. Messung mittels CLSM. Angabe der $[Ca^{2+}]_i$ in AU. Angabe der Den-Konzentrationen in Molarität. Analyse mittels Wilcoxon-matched-pairs-signed-rank-Test mit Angabe des p-Wertes.

Die prozentualen Anstiege des intrazellulären Kalziums der CCK⁻-Zellen wurden statistisch mit dem Mann-Whitney-Test mit denen der CCK⁺-Zellen verglichen (Abbildung 23). In der Tendenz reagierten die CCK⁺-Zellen etwas stärker als die CCK⁻-Zellen. Im Mann-Whitney-Test ergab sich jedoch für keine Konzentration ein signifikanter Unterschied im Reaktionsausmaß (Abbildung 23). Es war jedoch auffällig, dass die p-Werte der Vergleiche der niedrigen Konzentrationen Den 1×10^{-6} M und Den 1×10^{-5} M deutlich niedriger waren als die der Vergleiche der höheren Konzentrationen. Mit einem p-Wert von 0,0515 war der Unterschied zwischen Den 1×10^{-6} M der CCK⁺-Zellen und der CCK⁻-Zellen sogar annähernd signifikant. Mit zunehmender Konzentration schien dieser Unterschied bzw. die Signifikanz jedoch immer geringer zu werden. Im Vergleich zwischen den Respondern der CCK⁻- und CCK⁺-Zellen, zeigte sich ebenfalls für keine der Den-Konzentrationen ein signifikanter Unterschied im Mann-Whitney-Test. Die p-Werte waren sogar teilweise deutlich höher als im Vergleich mit der Gesamtheit aller Zellen. Am ausgeprägtesten war der Unterschied zwischen den Zellen allerdings ebenfalls auf die Konzentration Den 1×10^{-6} M.

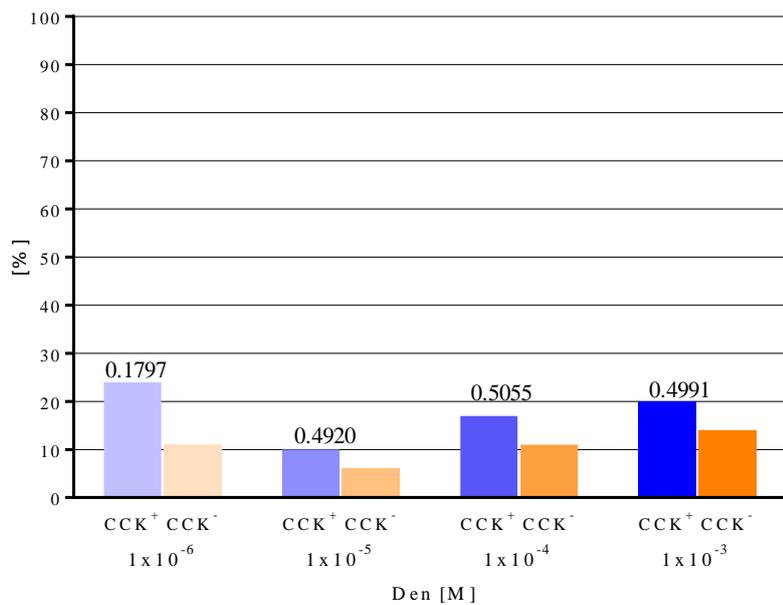


Abbildung 22 Prozentualer Anteil an CCK⁺- (blau) und CCK⁻- (orange) Zellen, die auf die jeweilige Konzentration von Denatonium mit einem mind. 10 %igen Anstieg reagierten (Responder). Analyse mittels Chi-square-Test unter Angabe der p-Werte. CCK⁺ n = 13 Zellen. CCK⁻ n = 10 Zellen

Zusammenfassend kann man also sagen, dass die CCK⁺-Zellen nach Stimulation mit Den Anstiege des intrazellulären Kalziums zeigten ohne eine klare Dosisabhängigkeit, was in ähnlicher Form auch bei CCK⁻-Zellen gefunden werden konnte. Dabei reagierten die CCK⁺-Zellen insbesondere auf niedrigere Konzentrationen tendenziell stärker als die CCK⁻-Zellen. In jeder Gruppe, also sowohl unter den CCK⁺-Zellen als auch unter den CCK⁻-Zellen, gab es auf jede Konzentration Den Responder, welche jedoch in keiner Gruppe besonders zahlreich zu sein schienen.

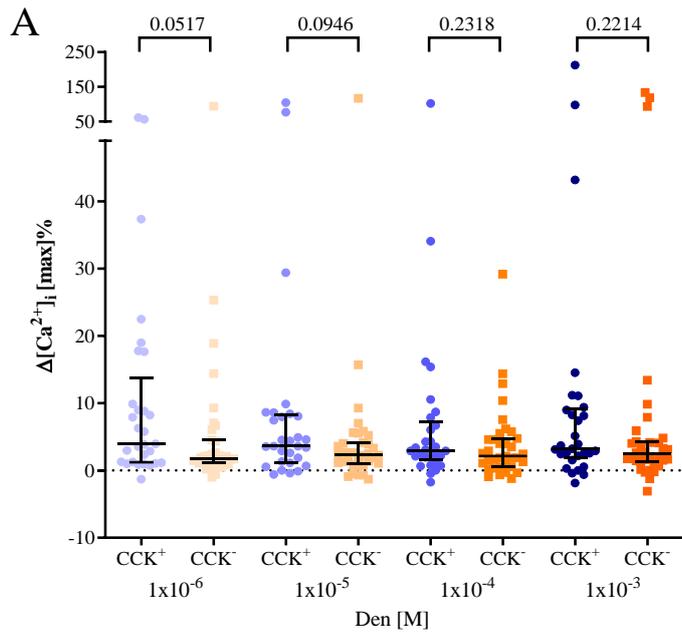
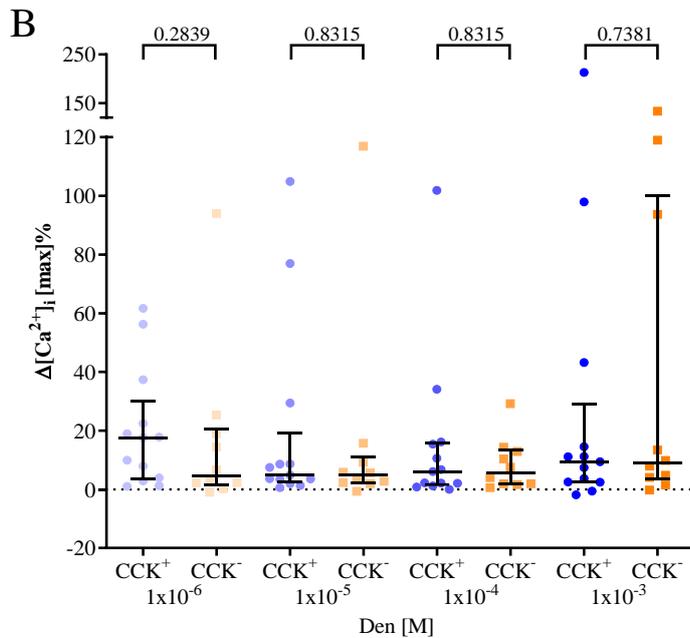


Abbildung 23 Vergleich der Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ in CCK⁺- (blau) und CCK⁻- (orange) Zellen nach Stimulation mit Den. Messung mittels CLSM. Angabe der Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ in Prozent auf der Y-Achse. Angabe des Medians mit Interquartilabstand. Analyse mittels Mann-Whitney-Test unter Angabe der p-Werte.

(A) CCK⁺ n = 24 Zellen von 7 Mäusen. CCK⁻ n = 35 Zellen von 6 Mäusen. (B) Darstellung der Responder. CCK⁺ n = 13 Zellen von 7 Mäusen. CCK⁻ n = 10 Zellen von 6 Mäusen.



3.4.3 Messungen des intrazellulären Kalziums nach Gabe von Dextromethorphan

Von insgesamt 5 Mäusen wurden 39 Zellen, die auf CCK reagierten, mit DXM in den Konzentrationen $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ bis $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ stimuliert (Abbildung 24). Insgesamt zeigte sich im Vergleich zu Den eine stabilere Baseline während der Messungen. Mit aufsteigender Konzentration stieg zunächst auch das intrazelluläre Kalzium stärker an. Nach Gabe der Maximalkonzentration DXM $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ erschien der Anstieg allerdings insgesamt gerin-

ger (Abbildung 24). Im Wilcoxon-matched-pairs-signed-rank-Test ergab sich für alle Konzentrationen ein signifikanter Anstieg des intrazellulären Kalziums (Abbildung 25).

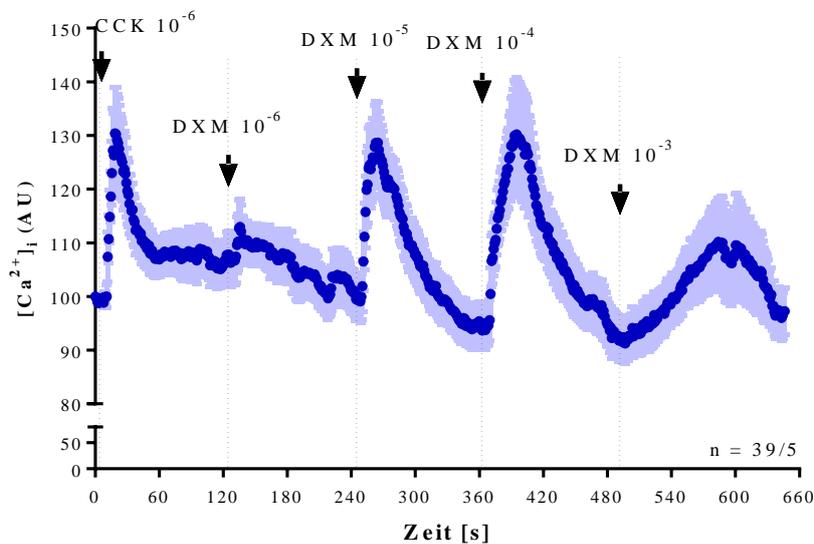


Abbildung 24 $[Ca^{2+}]_i$ der CCK⁺-Zellen der Gallenblase nach Zugabe von DXM im Zeitverlauf. $N = 39$ Zellen von 5 Mäusen. Angabe der $[Ca^{2+}]_i$ in AU auf der Y-Achse. X-Achse beschreibt Zeit in Sekunden. Angabe der Konzentrationen in Molarität. Pfeile markieren die Stimulussetzung. Gezeigt werden Mittelwert und Standardfehler.

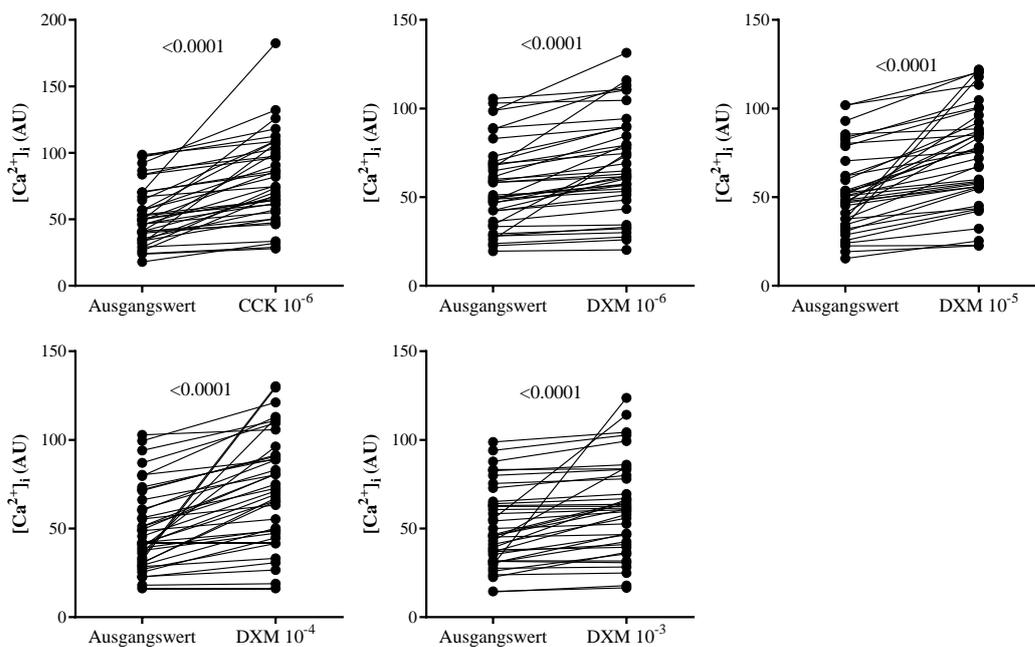


Abbildung 25 $[Ca^{2+}]_i$ vor und nach Stimulussetzung mit CCK oder DXM. Messung mittels CLSM. Angabe der $[Ca^{2+}]_i$ in AU. Angabe der Konzentrationen in Molarität. Analyse mittels Wilcoxon-matched-pairs-signed-rank-Test mit Angabe des p-Wertes. $N = 39$ Zellen von 5 Mäusen.

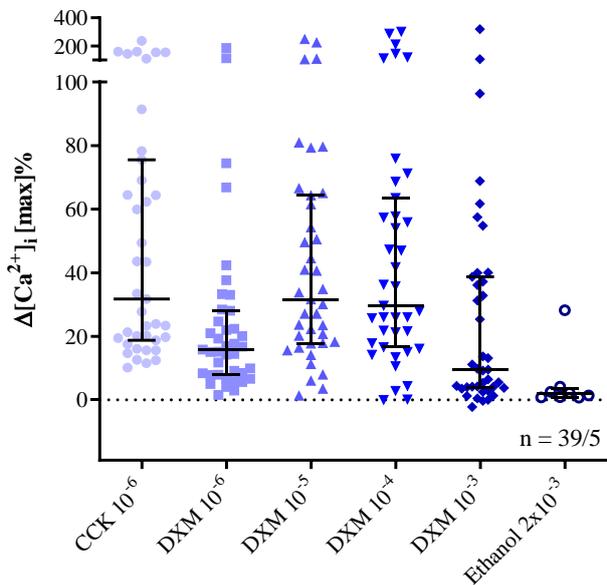
Im Vergleich der prozentualen Anstiege des intrazellulären Kalziums nach Gabe der unterschiedlichen Konzentrationen von DXM zeigten sich im Friedman-Test teilweise signifikante Unterschiede (Abbildung 26 A, Tabelle 27). Im Vergleich zu CCK gab es signifikante Unterschiede zu den Konzentrationen DXM 1×10^{-6} M und DXM 1×10^{-3} M. Auf die DXM-Konzentration 1×10^{-3} M reagierten die Zellen im Median am geringsten.

Zwischen CCK und den DXM-Konzentrationen 1×10^{-5} M und 1×10^{-4} M gab es keinen signifikanten Unterschied im Reaktionsausmaß (Abbildung 26 A). Die Vehikelkontrolle mit der Maximalkonzentration Ethanol 2×10^{-3} M wurde an 8 CCK⁺-Zellen von 3 Mäusen durchgeführt und zeigte im Median ein Reaktionsausmaß von 1,8 % mit einem Maximalwert von 28,19 % bei einer Zelle. Im Vergleich der prozentualen Anstiege nach DXM und Vehikelgabe zeigte sich im Mann-Whitney-Test für alle Konzentrationen ein signifikanter Unterschied (Tabelle 27). Bei Betrachtung der Gesamtheit aller CCK⁺-Zellen fiel auf, dass jede Zelle auf mindestens eine DXM-Konzentration einen Anstieg des intrazellulären Kalziums um mindestens 10 % aufwies. Das bedeutet, dass alle CCK⁺-Zellen also DXM-Responder sind.

Um zu testen, ob ein Zusammenhang zwischen den Ausmaßen der Anstiege des intrazellulären Kalziums nach CCK- und nach DXM-Gabe bestand, wurden die Kalziumanstiege im Verhältnis zu CCK berechnet (Abbildung 26 B). Genau wie bei den maximalen prozentualen Anstiegen gab es bei DXM 1×10^{-6} M im Friedman-Test einen signifikanten Unterschied zu den Konzentrationen DXM 1×10^{-5} M und DXM 1×10^{-4} M, nicht aber zu DXM 1×10^{-3} M. Auch im Verhältnis zu CCK schienen die mittleren Konzentrationen DXM 1×10^{-5} M und DXM 1×10^{-4} M insgesamt das größte Reaktionsausmaß zu zeigen. Der Unterschied zwischen diesen beiden Konzentrationen war dabei nicht signifikant. Insgesamt zeigte sich für die Konzentrationen DXM 1×10^{-6} M und DXM 1×10^{-3} M ein Reaktionsausmaß, was im Median etwa der Hälfte von CCK entsprach und für die Konzentrationen DXM 1×10^{-5} M und DXM 1×10^{-4} M ein Reaktionsausmaß, welches im Median etwa dem von CCK entsprach (Abbildung 26 B).

Es wurden Vehikelkontrollen mit der Maximalkonzentration Ethanol 2×10^{-3} M durchgeführt mit vorheriger und anschließender Gabe von CCK 1×10^{-6} M. Dabei zeigte sich im Dunn's-multiple-comparison-Test ein signifikanter Unterschied zwischen dem Anstieg des intrazellulären Kalziums nach der ersten CCK-Gabe und der Vehikelgabe. Zwischen den Reaktionsausmaßen der ersten und der zweiten CCK-Gabe ergab sich kein signifikanter Unterschied, wobei der Median nach der ersten Gabe mit 36 % deutlich höher lag als nach der zweiten Gabe mit etwa 4 %. In den Maximalwerten unterschieden sich die Reaktionsausmaße nach den beiden CCK-Gaben jedoch nur gering (Abbildung 27).

A



B

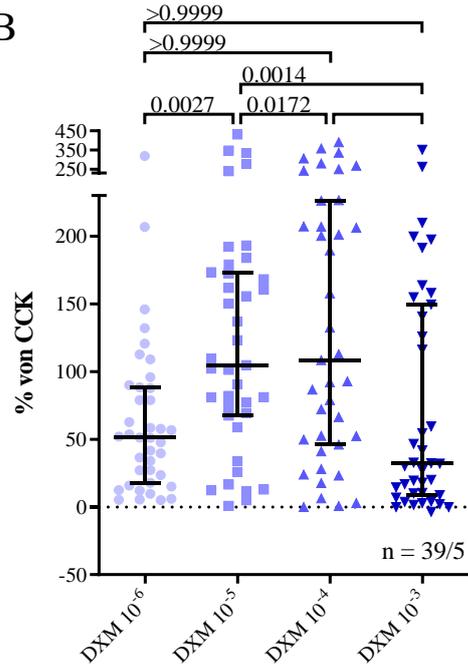


Abbildung 26 (A) Maximale Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ der glatten Muskelzellen der Gallenblase nach Stimulation mit DXM. (B) Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ der glatten Muskelzellen im Verhältnis zur Antwort auf CCK. Darstellung des Medians mit Interquartilabstand. Angabe der Konzentrationen in Molarität. Alle Zellen sind Responder. (A) $N = 39$ Zellen von 5 Mäusen für die Experimente mit DXM. Maximale Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ nach Stimulusgabe im Verhältnis zum Ausgangswert. Angabe der Kalziumänderung in Prozent. Vehikelkontrolle mit Maximalkonzentration Ethanol aus separatem Experiment mit $n = 8$ Zellen von 3 Mäusen. (B) Maximale Reaktion auf DXM in Prozent der maximalen Reaktion auf CCK. $N = 39$ Zellen von 5 Mäusen. Analyse mit Friedman-Test mit Angabe der p-Werte.

Tabelle 27 Analyse mit Friedman-Test. Vergleich der Kalziumreaktionen auf unterschiedliche Konzentrationen DXM mit der Reaktion auf CCK und der Konzentrationen untereinander. Vehikelkontrolle mit Maximalkonzentration Ethanol aus separatem Experiment mit $n = 8$ Zellen von 3 Mäusen. Statistischer Vergleich von Ethanol mit DXM in unterschiedlichen Konzentrationen mittels Mann-Whitney-Test, Angabe der p-Werte.

	CCK 10^{-6}	DXM 10^{-6}	DXM 10^{-5}	DXM 10^{-4}	Ethanol 2×10^{-3}
DXM 10^{-6}	0,0099				0,0002
DXM 10^{-5}	> 0,9999	0,0077			< 0,0001
DXM 10^{-4}	> 0,9999	0,0015	> 0,9999		0,0002
DXM 10^{-3}	0,0265	> 0,9999	0,0209	0,0045	0,0098

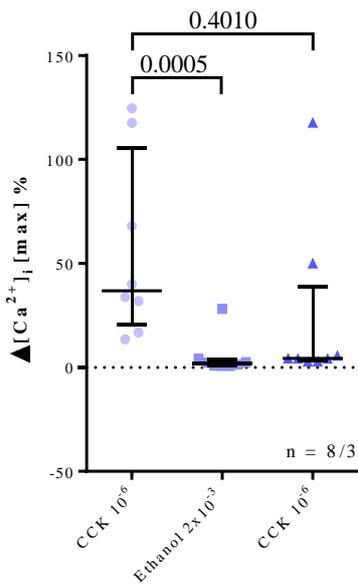


Abbildung 27 Vehikelkontrolle für DXM und Quinin mit Ethanol 2×10^{-3} M und anschließender CCK-Kontrolle. Effekt von CCK auf die glatte Muskelzelle vor und nach Vehikelgabe. $N = 8$ Zellen von 3 Mäusen. Messung mittels CLSM. Angabe der Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ in Prozent. Darstellung des Medians mit Interquartilabstand. Analyse mittels Dunn's-multiple-comparison-Test unter Angabe der p -Werte.

Um zu testen, ob der geringe Anstieg des intrazellulären Kalziums nach der Gabe von DXM 1×10^{-3} M auf eine mögliche Desensitivierung zurückzuführen war, wurden Experimente durchgeführt, in denen 16 CCK⁺-Zellen von 4 Mäusen direkt mit der Maximalkonzentration DXM 1×10^{-3} M stimuliert wurden, ohne vorherige Gabe der Konzentrationsreihe (Abbildung 28).

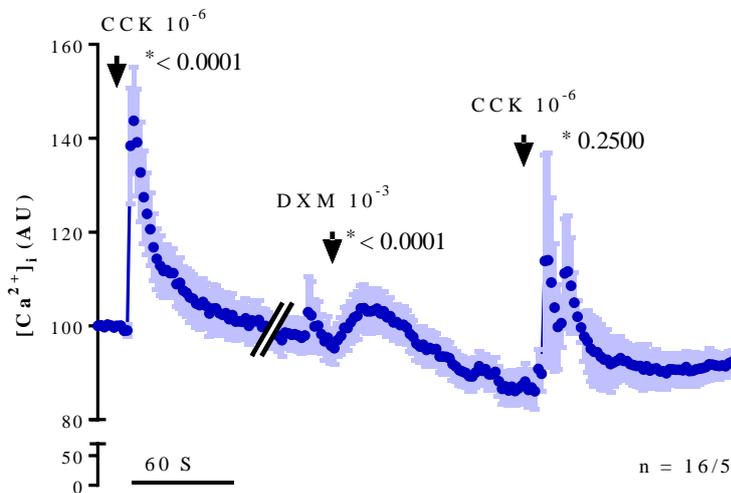


Abbildung 28 $[Ca^{2+}]_i$ der CCK⁺-Zellen der Gallenblase einer Maus nach direkter Stimulation mit der Maximalkonzentration DXM im Zeitverlauf. $N = 16$ Zellen von 5 Mäusen. Angabe der $[Ca^{2+}]_i$ in AU auf der Y-Achse. Angabe der Konzentrationen in Molarität. Pfeile markieren die Stimulussetzung. Gezeigt werden Mittelwert und Standardfehler. Analyse mittels Wilcoxon-matched-pairs-signed-rank-Test unter Angabe der p -Werte.

Im Vergleich mit CCK ergab sich für den maximalen prozentualen Anstieg nach der Gabe von DXM 1×10^{-3} M im Wilcoxon-matched-pairs-signed-rank-Test ein signifikanter Unterschied (Abbildung 29 A). Im Vergleich mit den Reaktionsausmaßen nach direkter Gabe DXM 1×10^{-3} M und Gabe nach der Konzentrationsreihe zeigte sich im Mann-Whitney-Test kein signifikanter Unterschied (Abbildung 29 B). Während es also bei Den

tatsächlich einen Unterschied zu machen schien, wann man die Maximalkonzentration direkt gab, zeigte sich dafür bei DXM keine Tendenz.

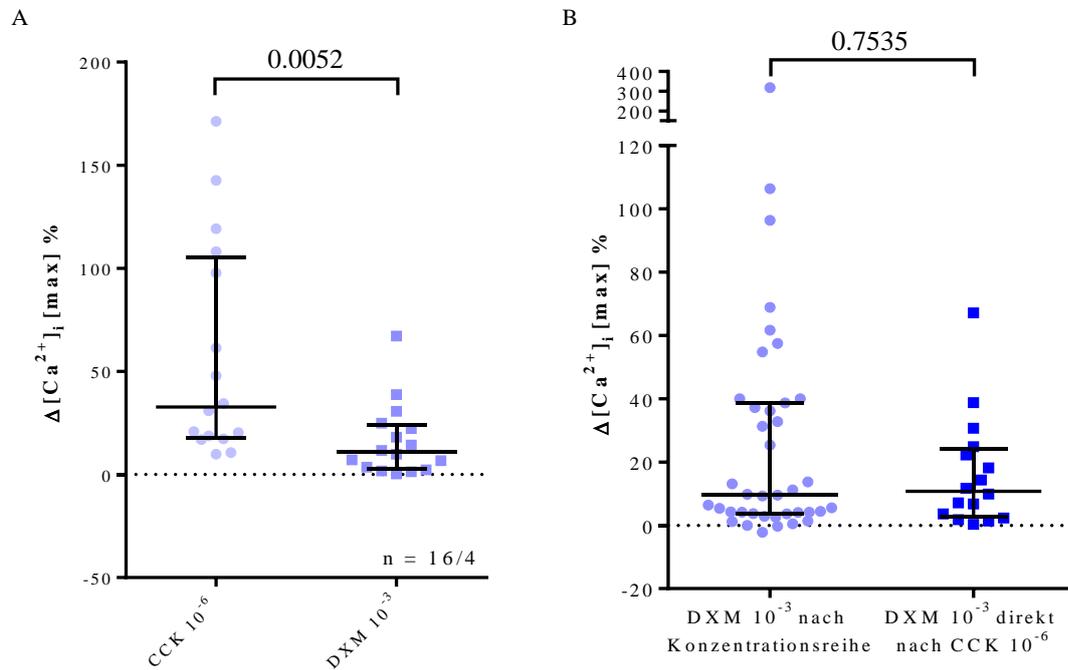


Abbildung 29 (A) Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ nach direkter Stimulation mit der Maximalkonzentration DXM und (B) Vergleich der Änderungen der $[Ca^{2+}]_i$ zwischen direkter Gabe der Maximalkonzentration DXM und nach Konzentrationsreihe. Angabe der Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ in Prozent auf der Y-Achse. Angabe der Konzentrationen in Molarität. Gezeigt werden Median und Interquartilabstand. (A) $N = 16$ Zellen von 4 Mäusen. Analyse mittels Wilcoxon matched-pairs signed rank Test und Angabe des p -Wertes. (B) Analyse mittels Mann-Whitney-Test und Angabe des p -Wertes.

Auch bei den CCK⁻-Zellen, von denen Messungen an 50 Zellen von 5 Mäusen durchgeführt wurden, gab es Anstiege des intrazellulären Kalziums nach Gabe von DXM (Abbildung 30). Im Wilcoxon-matched-pairs-signed-rank-Test zeigten sich signifikante Anstiege für alle Konzentrationen (Abbildung 31). Wie auch bei den CCK⁺-Zellen schien das intrazelluläre Kalzium zunächst dosisabhängig mit steigender Konzentration DXM auch vermehrt anzusteigen, wobei das Reaktionsausmaß nach Stimulation mit DXM 1×10^{-3} M wieder abnahm.

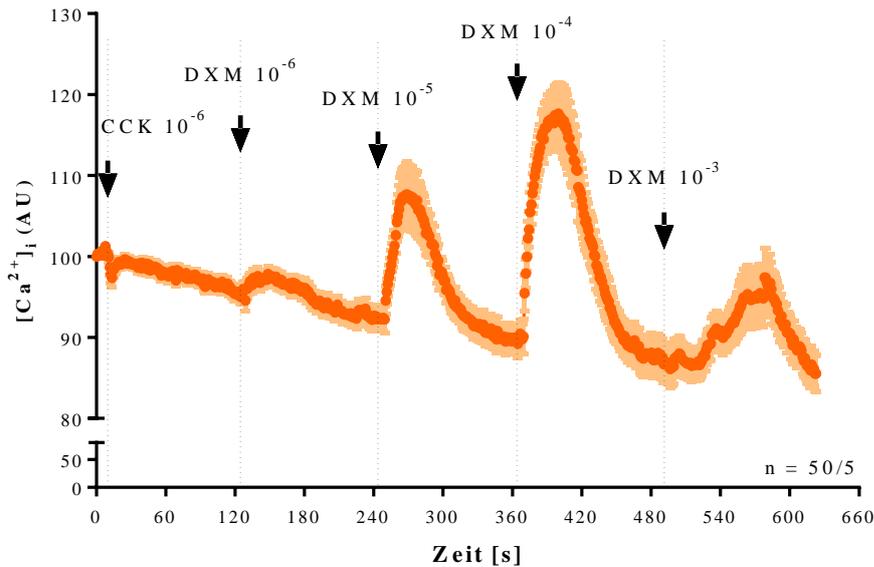


Abbildung 30 $[Ca^{2+}]_i$ nach Stimulation mit DXM von CCK⁻-Zellen im Zeitverlauf. $N = 50$ Zellen von 5 Mäusen. Angabe der $[Ca^{2+}]_i$ in AU auf der Y-Achse. X-Achse beschreibt Zeit in Sekunden. Angabe der Konzentrationen in Molarität. Einschlusskriterium für die Zellen war ein fehlender Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ nach CCK-Gabe ($< 10\%$). Pfeile markieren die Stimulussetzung. Gezeigt werden Mittelwert und Standardfehler.

Unter den CCK⁻-Zellen, die mit DXM stimuliert wurden, wurden insgesamt 88 % als Responder definiert. Vergleicht man die CCK⁺- und die CCK⁻-Zellen anhand der Anzahl der Responder auf die unterschiedlichen DXM-Konzentrationen, fiel auf, dass es insbesondere auf die niedrigen Konzentrationen DXM 1×10^{-6} M und DXM 1×10^{-5} M unter den CCK⁺-Zellen deutlich mehr Responder zu geben schien als unter den CCK⁻-Zellen (Abbildung 32). Im Chi-square-Test zeigten sich hier signifikante Unterschiede. In den höheren Konzentrationen DXM 1×10^{-4} M und 1×10^{-3} M glich sich die Anzahl der Responder an. Auf Stimulation mit DXM 1×10^{-3} M reagierten sogar etwas mehr CCK⁻-Zellen, wobei im Chi-square-Test kein signifikanter Unterschied festgestellt werden konnte. Im Vergleich zwischen den CCK⁺-Zellen und den CCK⁻-Zellen zeigte sich im Mann-Whitney-Test für die prozentualen Anstiege des intrazellulären Kalziums ein signifikanter Unterschied in den niedrigen Konzentrationen DXM 1×10^{-6} M und DXM 1×10^{-5} M. In den höheren Konzentrationen DXM 1×10^{-4} M und DXM 1×10^{-3} M war dies jedoch nicht mehr der Fall. Je höher also die Konzentration DXM war, desto geringer wurde der Unterschied im Reaktionsausmaß zwischen CCK⁺-Zellen und CCK⁻-Zellen (Abbildung 33 A). Vergleicht man nur die Responder der CCK⁺- und CCK⁻-Zellen miteinander, zeigten sich, was die Signifikanz der Unterschiede im Mann-Whitney-Test betraf, keine wesentlichen Unterschiede (Abbildung 33 B).

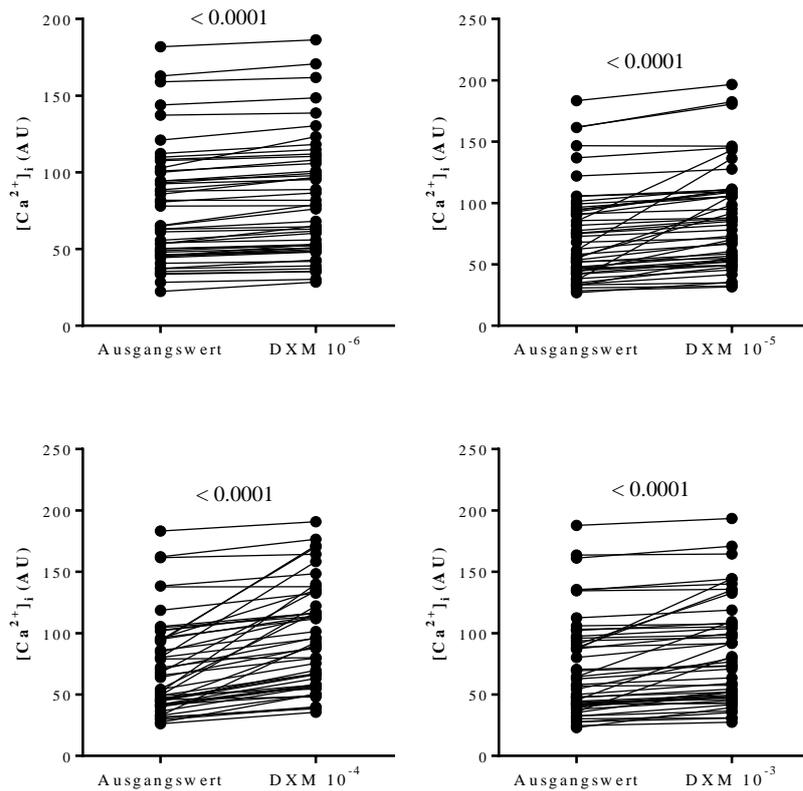


Abbildung 31 $[Ca^{2+}]_i$ vor und nach Stimulussetzung mit DXM in CCK⁻ Zellen der Gallenblase von Mäusen. Angabe der $[Ca^{2+}]_i$ in AU. Angabe der DXM-Konzentrationen in Molarität. Analyse mittels Wilcoxon-matched-pairs-signed-rank-Test mit Angabe des p-Wertes.

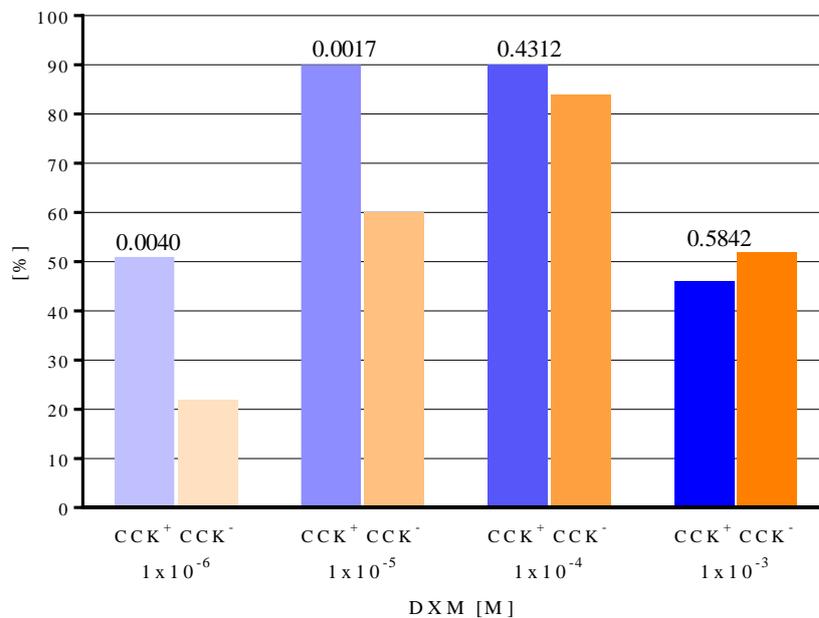


Abbildung 32 Prozentualer Anteil an CCK⁺- (blau) und CCK⁻- (orange) Zellen, die auf die jeweilige Konzentration von DXM mit einem mind. 10 %igen Anstieg reagiert haben (Responder). Analyse mittels Chi-square-Test unter Angabe der p-Werte. CCK⁺ n = 39 Zellen. CCK⁻ n = 44 Zellen.

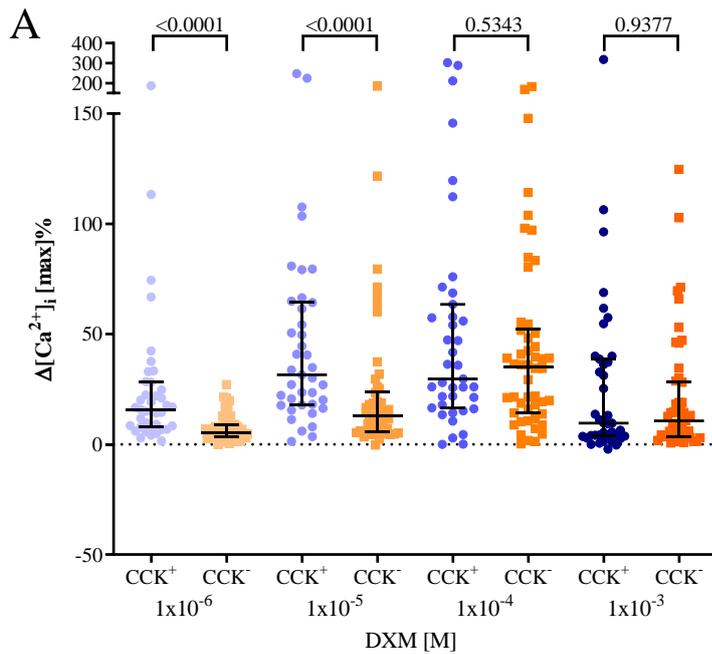
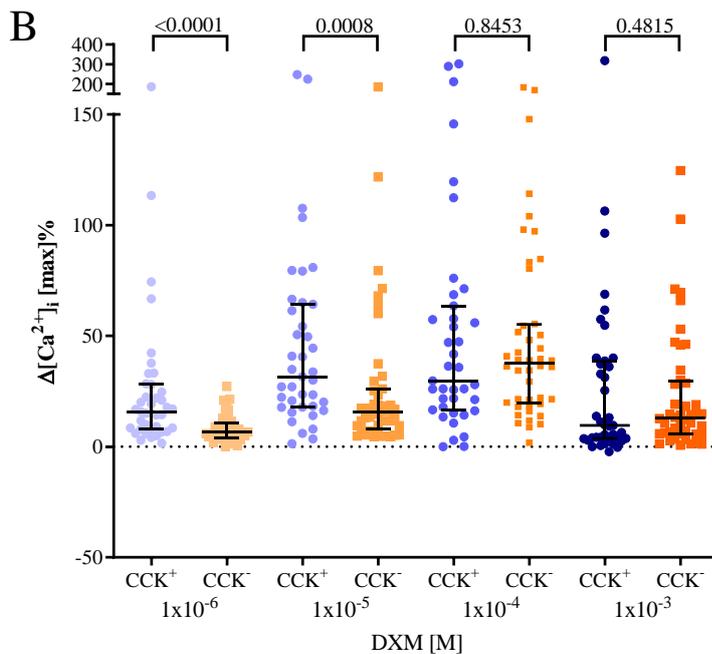


Abbildung 33 Vergleich der Änderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ von CCK⁺-Zellen (blaue Kreise) und CCK⁻-Zellen (orangene Quadrate) nach Stimulation mit DXM. Angabe der Änderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in Prozent auf der Y-Achse. Angabe des Medians mit Interquartilabstand. Analyse mittels Mann-Whitney-Test unter Angabe der p-Werte. (A) CCK⁺ $n = 39$ Zellen von 5 Mäusen. CCK⁻ $n = 50$ Zellen von 5 Mäusen. (B) Darstellung der Responder. CCK⁺ $n = 39$ Zellen von 5 Mäusen. CCK⁻ $n = 44$ Zellen von 5 Mäusen.



Zusammenfassend kann man also sagen, dass es nach Gabe von DXM sowohl in den CCK⁺-Zellen, als auch in den CCK⁻-Zellen zu einem Anstieg des intrazellulären Kalziums kam, welcher eine gewisse Konzentrationsabhängigkeit zeigte. Im Vergleich zu Den, gab es unter den CCK⁺-Zellen deutlich mehr Responder, insbesondere in niedrigeren Konzentrationen auch signifikant mehr als unter den CCK⁻-Zellen, sodass sich hier gewisse spezifische Effekte von DXM auf CCK⁺-Zellen nicht ausschließen lassen und weiter diskutiert werden müssen.

3.4.4 Messungen des intrazellulären Kalziums nach Gabe von Quinin

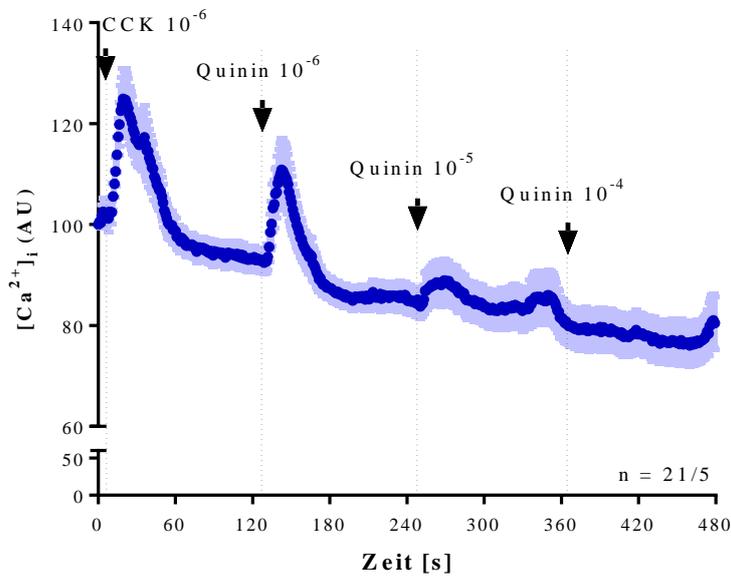


Abbildung 34 $[Ca^{2+}]_i$ der CCK^+ -Zellen der Gallenblase nach Zugabe von Quinin im Zeitverlauf. $N = 21$ Zellen von 5 Mäusen. Angabe der $[Ca^{2+}]_i$ in AU auf der Y-Achse. X-Achse beschreibt Zeit in Sekunden. Angabe der Konzentrationen in Molarität. Pfeile markieren die Stimulussetzung. Gezeigt werden Mittelwert und Standardfehler.

Auch nach Gabe von Quinin in den Konzentrationen 1×10^{-6} M bis 1×10^{-4} M zeigten die CCK^+ -Zellen Anstiege des intrazellulären Kalziums unterschiedlichen Ausmaßes mit einer gewissen Konzentrationsabhängigkeit. Getestet wurde an 21 Zellen von 5 Mäusen.

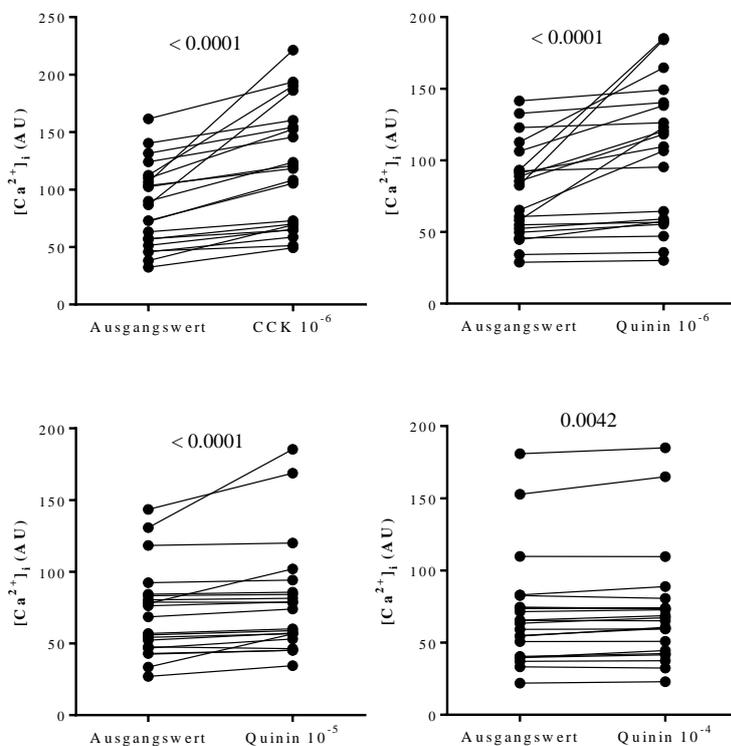


Abbildung 35 $[Ca^{2+}]_i$ vor und nach Stimulation mit CCK oder Quinin. Angabe der $[Ca^{2+}]_i$ in AU. Angabe der Konzentrationen in Molarität. Analyse mittels Wilcoxon-matched-pairs-signed-rank-Test mit Angabe des p-Wertes.

Auch hier zeigte sich im zeitlichen Verlauf während der Messungen ein stetiger Abfall der Baseline (Abbildung 34). Der größte Anstieg des intrazellulären Kalziums zeigte sich bei der niedrigsten Konzentration Quinin 1×10^{-6} M. Mit steigender Konzentration schien das Reaktionsausmaß abzunehmen (Abbildung 34). Nach der Gabe von Quinin 1×10^{-5} M kam es zu einer Art doppelgipfligem Anstieg des intrazellulären Kalziums. Auf Quinin 1×10^{-4} M schienen die CCK⁺-Zellen kaum noch zu reagieren. Im Wilcoxon-matched-pairs-signed-rank-Test ergaben sich für alle Konzentrationen signifikante Anstiege (Abbildung 35). Den größten prozentualen Anstieg des intrazellulären Kalziums gab es bei der Konzentration Quinin 1×10^{-6} M mit 12 % im Median. Zu den Reaktionsausmaßen nach dieser Konzentration zeigte sich im Vergleich zu CCK und Quinin 1×10^{-5} M im Friedman-Test kein signifikanter Unterschied, zu Quinin 1×10^{-4} M jedoch schon. Einen signifikanten Unterschied zu Quinin 1×10^{-5} M gab es lediglich im Vergleich mit CCK. Der geringste Anstieg des intrazellulären Kalziums zeigte sich nach Gabe von Quinin 1×10^{-4} M mit etwa 2 % im Median. Im Vergleich zur Vehikelkontrolle mit der Maximalkonzentration Ethanol 2×10^{-3} M zeigte sich ein signifikanter Unterschied zu Quinin 1×10^{-6} M im Mann-Whitney-Test. Der Unterschied war bereits bei Quinin 1×10^{-5} M nicht mehr signifikant und die p-Werte wurden mit steigender Konzentration größer (Abbildung 36, Tabelle 28).

Unter allen CCK⁺-Zellen, die mit Quinin stimuliert wurden, wurden 76 % als Responder identifiziert. Die statistische Analyse der Responder zeigte jedoch keine wegweisenden Unterschiede im Vergleich zu der Grundgesamtheit der Zellen. Im Mann-Whitney-Test zeigte sich in Bezug auf die Vehikelkontrolle ebenfalls lediglich ein signifikanter Unterschied zu der Konzentration Quinin 1×10^{-6} M. Weiterhin zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied im Friedman-Test zwischen den Konzentrationen Quinin 1×10^{-6} M und Quinin 1×10^{-4} M.

Um zu überprüfen, ob das Ausmaß des Anstiegs des intrazellulären Kalziums nach Quinin-Gabe im Zusammenhang mit dem Reaktionsausmaß auf CCK stand, wurden die Werte in Relation zu CCK gesetzt (Abbildung 37 A). Dabei zeigte sich ebenfalls ein abnehmendes Reaktionsausmaß mit steigender Konzentration Quinin. Im Median waren die Reaktionsausmaße in allen Konzentrationen im Verhältnis zu CCK geringer. Signifikante Unterschiede ergaben sich im Friedman-Test zwischen den Konzentrationen Quinin 1×10^{-6} M und Quinin 1×10^{-4} M, sowie zwischen Quinin 1×10^{-5} M und Quinin 1×10^{-4} M (Abbildung 37 A). Betrachtete man auch hier nur die Responder, zeigte sich ein ähnliches

Bild (Abbildung 37 B). Einen statistisch signifikanten Unterschied im Friedman-Test gab es unter den Respondern nur zwischen den Konzentrationen Quinin 1×10^{-6} M und Quinin 1×10^{-4} M.

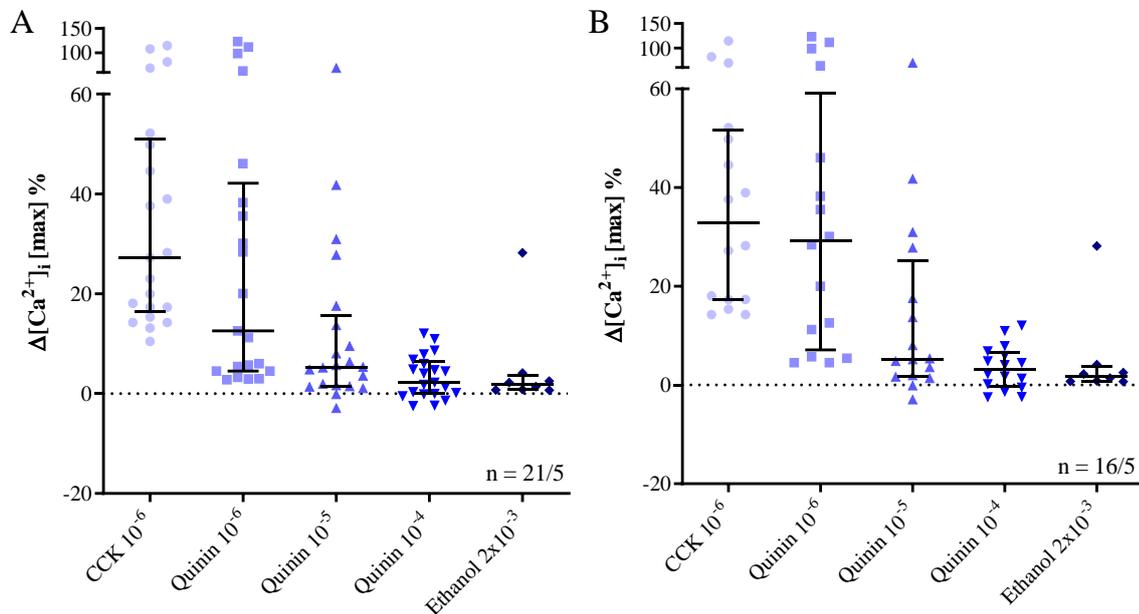


Abbildung 36 Maximale Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ der glatten Muskelzellen der Gallenblase nach Stimulation mit Quinin im Verhältnis zum Ausgangswert.. Darstellung des Medians mit Interquartilabstand. Angabe der Kalziumänderung in Prozent. Angabe der Konzentrationen in Molarität. Vehikelkontrolle mit Maximalkonzentration Ethanol aus separatem Experiment mit $n = 8$ Zellen von 3 Mäusen. (A) $N = 21$ Zellen von 5 Mäusen für die Experimente mit Quinin. (B) Darstellung der Responder. $N = 16$ Zellen von 5 Mäusen für die Experimente mit Quinin.

Tabelle 28 Analyse mit Friedman-Test. Vergleich der Kalziumreaktionen auf unterschiedliche Konzentrationen Quinin mit der Reaktion auf CCK und der Konzentrationen untereinander. Vergleich der Kalziumreaktionen der Responder auf unterschiedliche Konzentrationen Quinin untereinander. Vehikelkontrolle mit Maximalkonzentration Ethanol aus separatem Experiment mit $n = 8$ Zellen von 3 Mäusen. Statistischer Vergleich von Ethanol mit Quinin in unterschiedlichen Konzentrationen mit Mann-Whitney-Test unter Angabe der p -Werte.

	CCK 10^{-6}	Quinin 10^{-6}	Quinin 10^{-5}	Ethanol 2×10^{-3}
Quinin 10^{-6}	0,7218			0,0004
Quinin 10^{-5}	0,0076	0,5660		0,0993
Quinin 10^{-4}	< 0,0001	0,0005	0,1392	0,9022
Responder				
Quinin 10^{-6}	>0,9999			0,0001
Quinin 10^{-5}	0,0557	0,3350		0,1164
Quinin 10^{-4}	<0,0001	0,0006	0,1018	0,8532

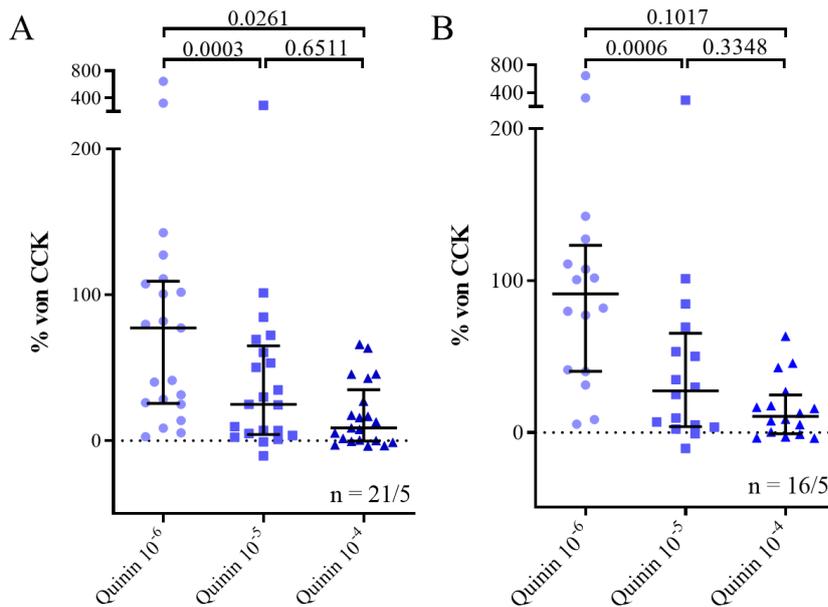


Abbildung 37 Änderung der der $[Ca^{2+}]_i$ glatten Muskelzellen der Gallenblase nach Stimulation mit Quinin im Verhältnis zur Antwort auf CCK. Darstellung des Medians mit Interquartilabstand. Maximale Reaktion auf Quinin in Prozent der maximalen Reaktion auf CCK. Analyse mit Friedman-Test mit Angabe der p-Werte. (A) $N = 21$ Zellen von 5 Mäusen. (B) Darstellung der Responder. $N = 16$ Zellen von 5 Mäusen.

Um zu überprüfen, ob der geringere Kalziumanstieg nach Gabe der Maximalkonzentration Quinin auf eine mögliche Desensitivierung der Zellen zurückzuführen ist, wurden an 14 Zellen von 8 Mäusen Versuche durchgeführt, in denen die Zellen direkt nach CCK-Gabe mit der Maximalkonzentration Quinin 1×10^{-4} M stimuliert wurden, ohne vorherige Gabe der Konzentrationsreihe (Abbildung 38). Auffällig war dabei ein vermindertes Reaktionsausmaß auf CCK nach vorheriger Gabe der Maximalkonzentration Quinin. Der maximale prozentuale Anstieg nach direkter Gabe von Quinin 1×10^{-4} M lag im Median bei etwa 6 %. Im Vergleich zu CCK ergab sich im Wilcoxon-matched-pairs-signed-rank-Test kein signifikanter Unterschied (Abbildung 39 A). Im Vergleich zwischen der direkten Gabe von Quinin 1×10^{-4} M und der Gabe nach der Konzentrationsreihe zeigte sich im Mann-Whitney-Test ein signifikanter Unterschied. Der Median des Reaktionsausmaßes nach Gabe von Quinin 1×10^{-4} M mit vorheriger Konzentrationsreihe betrug mit etwa 2 % nur ein Drittel von dem Reaktionsausmaß nach direkter Gabe von Quinin 1×10^{-4} M (Abbildung 39 B). Dieser signifikante Unterschied bestätigte sich ebenfalls in der isolierten Betrachtung der Responder (Abbildung 39 C). Gründe für diese Unterschiede im Reaktionsausmaß müssen diskutiert werden.

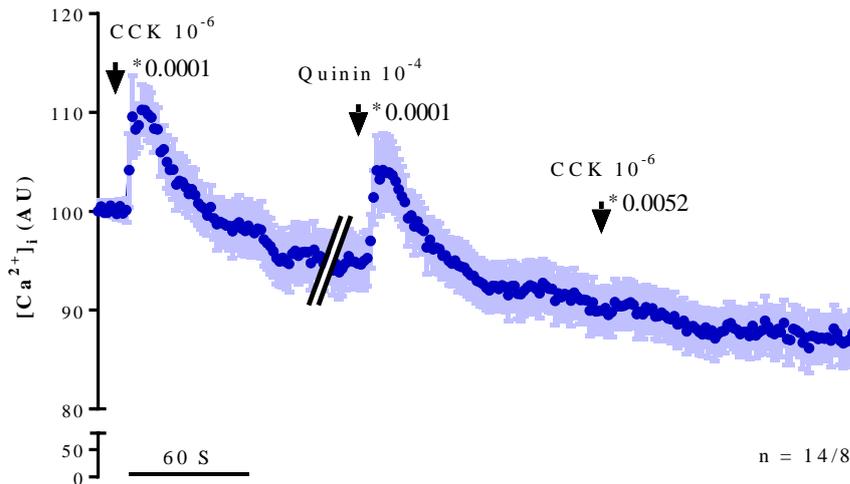


Abbildung 38 $[Ca^{2+}]_i$ der CCK⁺-Zellen der Gallenblase einer Maus nach direkter Stimulation mit der Maximalkonzentration Quinin im Zeitverlauf. $N = 14$ Zellen von 8 Mäusen. Angabe der $[Ca^{2+}]_i$ in AU auf der Y-Achse. Angabe der Konzentrationen in Molarität. Pfeile markieren die Stimulussetzung. Gezeigt werden Mittelwert und Standardfehler. Analyse der Kalziumanstiege mittels Wilcoxon-matched-pairs-signed-rank-Test unter Angabe der (*) p-Werte.

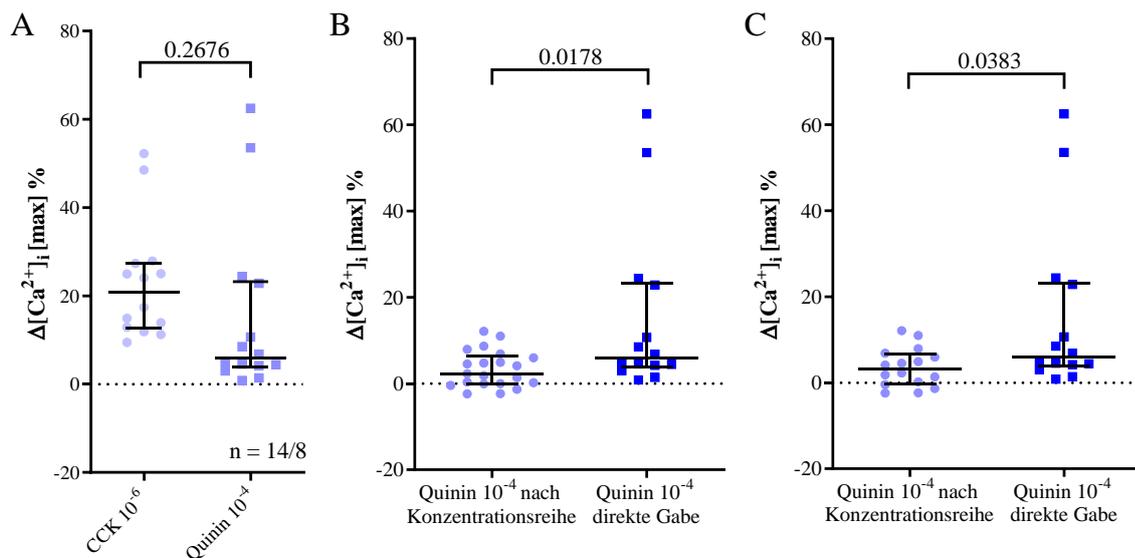


Abbildung 39 Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ nach (A) direkter Stimulation mit der Maximalkonzentration Quinin und (B) Vergleich der Änderungen der $[Ca^{2+}]_i$ zwischen direkter Gabe der Maximalkonzentration Quinin und nach Konzentrationsreihe. (C) Darstellung der Responder. Angabe der Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ in Prozent auf der Y-Achse. Angabe der Konzentrationen in Molarität. Gezeigt werden Median und Interquartilabstand. (A) $N = 14$ Zellen von 8 Mäusen. Analyse mittels Wilcoxon-matched-pairs-signed-rank-Test und Angabe des p-Wertes. (B, C) Analyse mittels Mann-Whitney-Test und Angabe des p-Wertes.

An 36 Zellen von 6 Mäusen wurden auch Messungen an CCK⁻-Zellen durchgeführt. Im Vergleich zu den CCK⁺-Zellen schien hier das Reaktionsausmaß umgekehrt zu verlaufen. Mit steigender Konzentration Quinin schien auch der Anstieg des intrazellulären Kalziums größer zu werden (Abbildung 40). Ein stetiger Abfall der Baseline zeigte sich

auch in diesen Versuchsreihen. Auch für die CCK⁻-Zellen zeigten sich im Wilcoxon-matched-pairs-signed-rank-Test signifikante Anstiege für alle Konzentrationen (Abbildung 41).

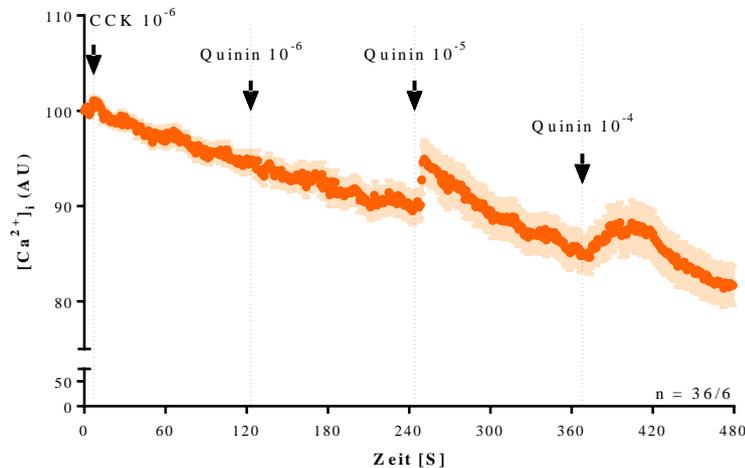


Abbildung 40 $[Ca^{2+}]_i$ nach Stimulation mit Quinin von CCK⁻-Zellen im Zeitverlauf. $N = 36$ Zellen von 6 Mäusen. Angabe der $[Ca^{2+}]_i$ in AU auf der Y-Achse. X-Achse beschreibt Zeit in Sekunden. Angabe der Konzentrationen in Molarität. Pfeile markieren die Stimulussetzung. Gezeigt werden Mittelwert und Standardfehler.

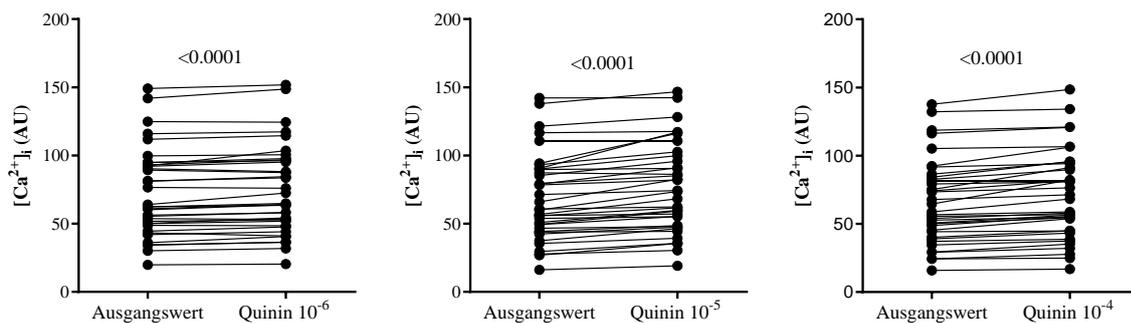


Abbildung 41 $[Ca^{2+}]_i$ vor und nach Stimulation mit Quinin in CCK⁻-Zellen der Gallenblase von Mäusen. Angabe der $[Ca^{2+}]_i$ in AU. Angabe der Quinin-Konzentrationen in Molarität. Analyse mittels Wilcoxon-matched-pairs-signed-rank-Test mit Angabe des p-Wertes.

Unter den CCK⁻-Zellen, die mit Quinin stimuliert wurden, wurden 58 % als Responder identifiziert. Verglich man die Anzahl der Responder der CCK⁺-Zellen und der CCK⁻-Zellen miteinander, zeigten sich im Chi-square-Test signifikante Unterschiede zwischen den Zellen nach Stimulation mit Quinin 1×10^{-6} M und mit Quinin 1×10^{-4} M. Nach Stimulation mit Quinin 1×10^{-6} M gab es allerdings unter den CCK⁺-Zellen deutlich mehr Responder, während es sich für die Zellen, die mit Quinin 1×10^{-4} M stimuliert wurden, genau umgekehrt verhielt. Hier gab es unter den CCK⁻-Zellen deutlich mehr Responder (Abbildung 42).

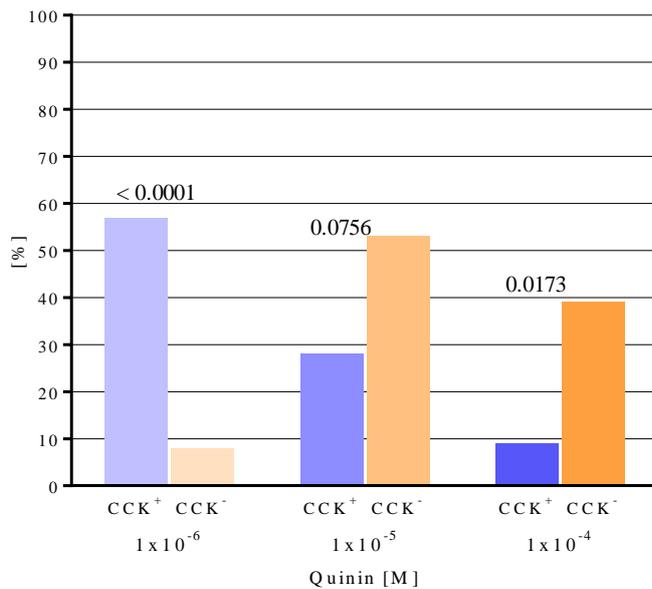


Abbildung 42 Prozentualer Anteil an CCK⁺- (blau) und CCK⁻- (orange) Zellen, die auf die jeweilige Konzentration von Quinin mit einem mind. 10 %igen Anstieg reagiert haben (Responder). Analyse mittels Chi-square-Test unter Angabe der p-Werte. CCK⁺ n = 16 Zellen. CCK⁻ n = 21 Zellen.

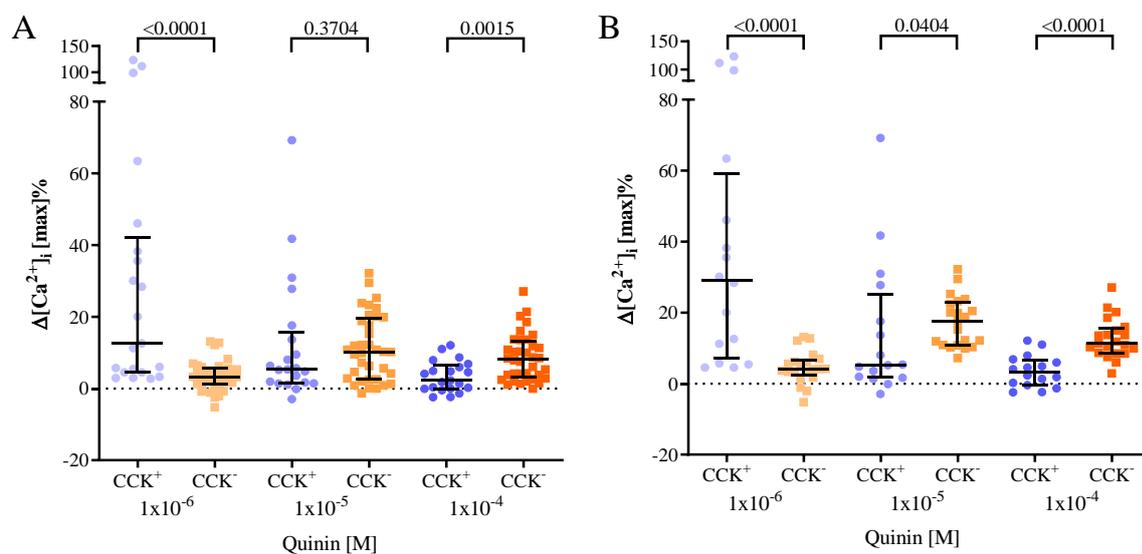


Abbildung 43 Vergleich der Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ von CCK⁺-Zellen (blaue Kreise) und CCK⁻-Zellen (orange Quadrate) nach Stimulation mit Quinin. Angabe der Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ in Prozent auf der Y-Achse. Angabe des Medians mit Interquartilabstand. Analyse mittels Mann-Whitney-Test unter Angabe der p-Werte. (A) CCK⁺ n = 21 Zellen von 5 Mäusen. CCK⁻ n = 36 Zellen von 6 Mäusen. (B) Darstellung der Responder. CCK⁺ n = 16 Zellen von 5 Mäusen. CCK⁻ n = 21 Zellen von 6 Mäusen.

Dieses Verhalten bestätigte sich ebenfalls im Vergleich der prozentualen Kalziumanstiege zwischen den CCK⁺-Zellen und den CCK⁻-Zellen. Auf die Konzentration Quinin 1×10^{-6} M reagierten die CCK⁻-Zellen im Median mit etwa 3 %. Die CCK⁺-Zellen reagierten mit etwa 12 % vier Mal stärker. Der Unterschied zwischen den beiden Zellgruppen war im Mann-Whitney-Test deutlich signifikant. Noch ausgeprägter war dieser Unterschied in der isolierten Betrachtung der Responder. Hier reagierten die CCK⁺-Zellen im

Median sogar mehr als sieben Mal stärker als die CCK⁻-Zellen (Abbildung 43 A). Auf die Konzentration Quinin 1×10^{-5} M reagierten die CCK⁻-Zellen im Median mit 10 % bereits etwas mehr als die CCK⁺-Zellen. Der Unterschied war im Mann-Whitney-Test jedoch nicht signifikant. Erst bei isolierter Betrachtung der Responder zeigte sich für diese Konzentration ein signifikanter Unterschied (Abbildung 43 B). Hier reagierten die CCK⁻-Responder mehr als drei Mal so stark wie die CCK⁺-Responder. Auch auf die Quinin-Konzentration 1×10^{-4} M reagierten die CCK⁻-Zellen signifikant stärker als die CCK⁺-Zellen.

Zusammenfassend ließ sich also feststellen, dass es sowohl unter den CCK⁺-Zellen als auch unter den CCK⁻-Zellen einige Responder gab, wobei insbesondere die CCK⁺-Zellen stärker auf die niedrigeren Konzentrationen Quinin reagierten, während die CCK⁻-Zellen eindeutig stärker auf die höheren Konzentrationen Quinin reagierten. Ein gewisser Desensibilisierungseffekt der CCK⁺-Zellen auf Quinin ist in diesem Falle jedoch nicht auszuschließen und muss weiter diskutiert werden.

3.5 Kalziummessungen an isolierten Zellen der Gallenblase von genetisch veränderten Mausstämmen

Um die Rolle des TRPM5-Kanals im Zusammenhang mit den Anstiegen des intrazellulären Kalziums in glatten Muskelzellen nach Bitterstimulation eingehender zu untersuchen, wurden Messungen an genetisch veränderten Mäusen durchgeführt, in denen der TRPM5-Kanal ausgeschaltet wurde (TRPM5-KO). Parallel dazu wurden Messungen an entsprechenden Wildtyp-Mäusen durchgeführt, um die Effekte miteinander zu vergleichen (TRPM5-WT). Das Reaktionsausmaß sowohl in den Zellen der genetisch veränderten Mausstämme als auch im Wildtyp schien insgesamt etwas geringer zu sein, als das der Zellen der C57BL/6J-Mäuse. Das zeigte sich insbesondere in den Reaktionsausmaßen nach Gabe von CCK (Abbildung 44). Hier zeigten sich im Dunn's-multiple-comparison-Test signifikante Unterschiede von den Zellen der C57BL/6J-Mäuse zu denen der genetisch veränderten Mäuse, wobei die Zellen der genetisch veränderten Mäuse im Median etwa gleich stark auf CCK reagierten und sich in der statistischen Analyse zwischen den beiden auch kein signifikanter Unterschied ergab.

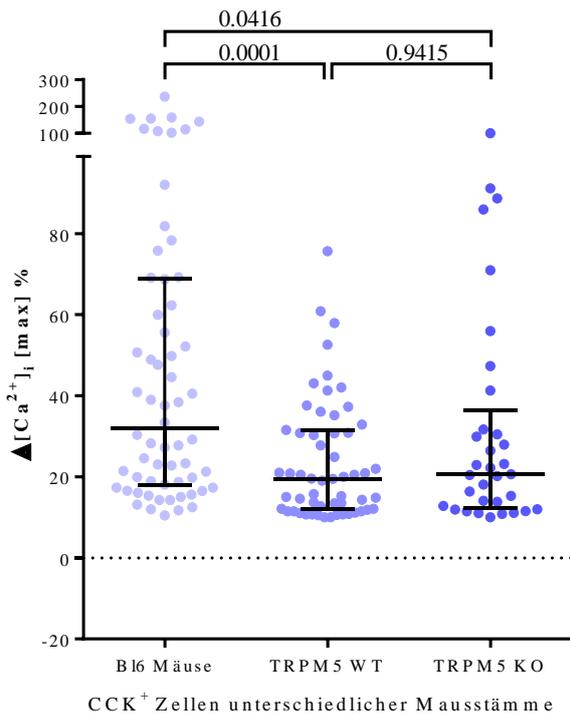


Abbildung 44 Vergleich der prozentualen Anstiege der $[Ca^{2+}]_i$ CCK⁺-Zellen von unterschiedlichen Mausstämmen nach Stimulation mit CCK 10^{-6} M. Angabe des maximalen prozentualen Anstiegs auf der Y-Achse. Bl6 Mäuse $n = 62$ Zellen. TRPM5-WT $n = 56$ Zellen. TRPM5-KO $n = 33$ Zellen. Darstellung des Medians mit Interquartilabstand. Statistische Analyse mittels Dunn's-multiple-comparison-Test unter Angabe der p-Werte.

3.5.1 Messungen des intrazellulären Kalziums nach Gabe von DXM an Zellen der Gallenblase von TRPM5-KO-Mäusen

Insgesamt 9 Zellen von 6 TRPM5-KO-Mäusen wurden mit DXM stimuliert und auf ihre Änderung des intrazellulären Kalziums hin untersucht. Während der Messungen an den Zellen der TRPM5-KO-Mäuse gestaltete es sich insgesamt schwierig, CCK⁺-Zellen zu finden. Die Anstiege nach CCK erschienen insgesamt auch eher schwach und kamen teilweise auch mit leichter Verzögerung. Daraus ergibt sich auch der in Abbildung 45 dargestellte niedrige Mittelwert, da in einigen Zellen das intrazelluläre Kalzium bereits wieder sank, während es in anderen gerade erst anstieg. Insgesamt erschienen die Anstiege des intrazellulären Kalziums nach Gabe von DXM besonders in niedriger Dosierung eher gering. Der größte Effekt zeigte sich nach Gabe von DXM in der Maximalkonzentration 1×10^{-3} M (Abbildung 45). Im Wilcoxon-matched-pairs-signed-rank-Test ergaben sich für alle Konzentrationen signifikante Anstiege (Abbildung 46).

Im Friedman-Test ergaben sich für die Konzentration DXM 1×10^{-6} M keine signifikanten Unterschiede zu den anderen Konzentrationen, wobei der p-Wert mit 0,0566 im Vergleich zu DXM 1×10^{-3} M nahezu signifikant war (Tabelle 29). Die Kalziumanstiege nach Gabe von DXM 1×10^{-5} M fielen insgesamt am geringsten aus. Ein signifikanter Unterschied ergab sich lediglich im Vergleich zu DXM 1×10^{-3} M. Auf die Konzentration DXM

$1 \times 10^{-4} \text{ M}$ gab es einen signifikanten Unterschied zu der Maximalkonzentration DXM $1 \times 10^{-3} \text{ M}$.

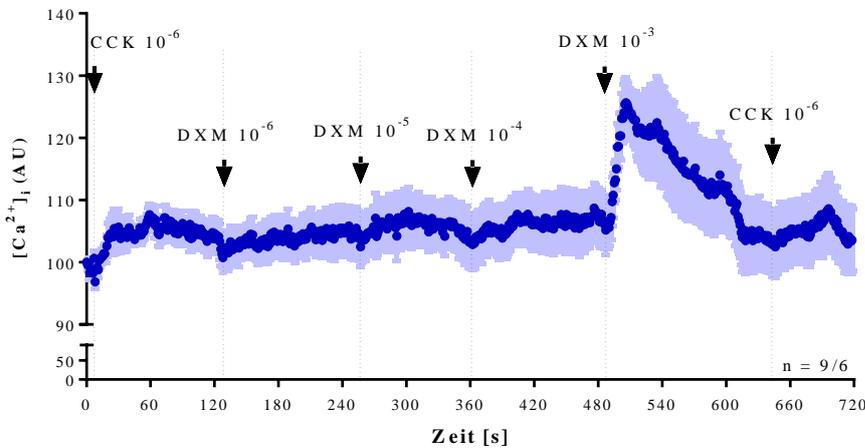


Abbildung 45 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ der CCK^+ -Zellen der Gallenblase von TRPM5-KO-Mäusen nach Zugabe von DXM im Zeitverlauf. $N = 9$ Zellen von 6 Mäusen. Angabe der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in AU auf der Y-Achse. X-Achse beschreibt Zeit in Sekunden. Angabe der Konzentrationen in Molarität. Pfeile markieren die Stimulussetzung. Gezeigt werden Mittelwert und Standardfehler.

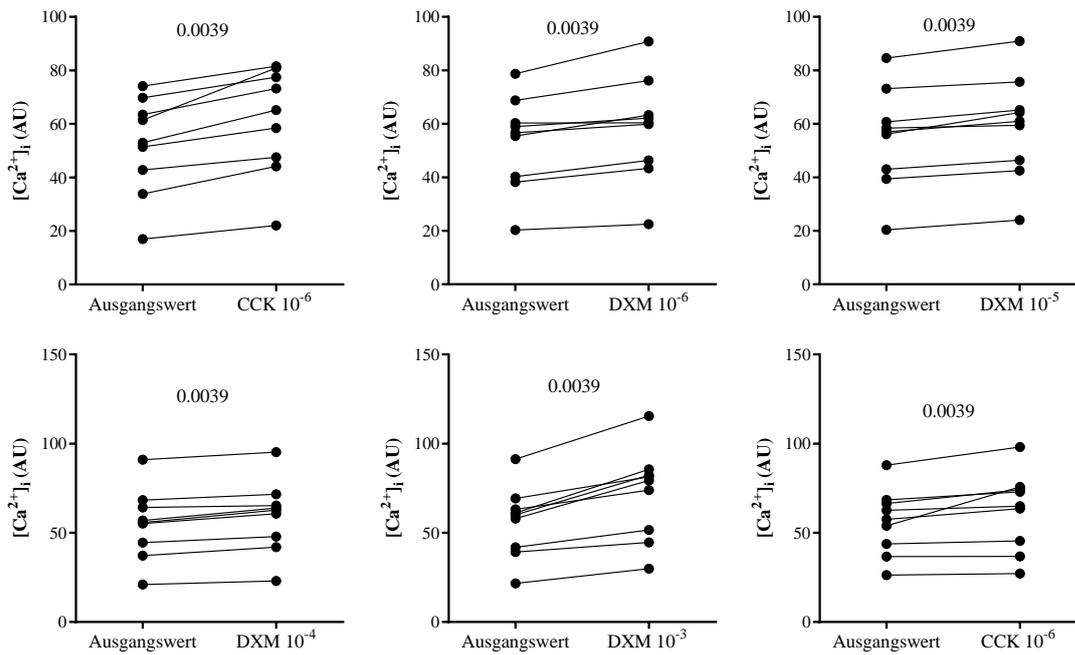


Abbildung 46 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ vor und nach Stimulation mit CCK oder DXM in glatten Muskelzellen der Gallenblase von TRPM5-KO-Mäusen. Messung mittels CLSM. Angabe der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in AU. Angabe der Konzentrationen in Molarität. Analyse mittels Wilcoxon-matched-pairs-signed-rank-Test mit Angabe des p -Wertes.

Am Ende der Konzentrationsreihe erfolgte eine erneute Gabe von CCK, nach der der Anstieg des intrazellulären Kalziums geringer auszufallen schien als nach der ersten Gabe, wobei sich in der statistischen Testung zwischen den beiden Gaben kein

signifikanter Unterschied zeigte (Abbildung 47 A, Tabelle 29). Obwohl die Reaktionen insbesondere im Bereich der niedrigen DXM-Konzentrationen gering ausfielen, wurden alle CCK⁺-Zellen als DXM-Responder identifiziert.

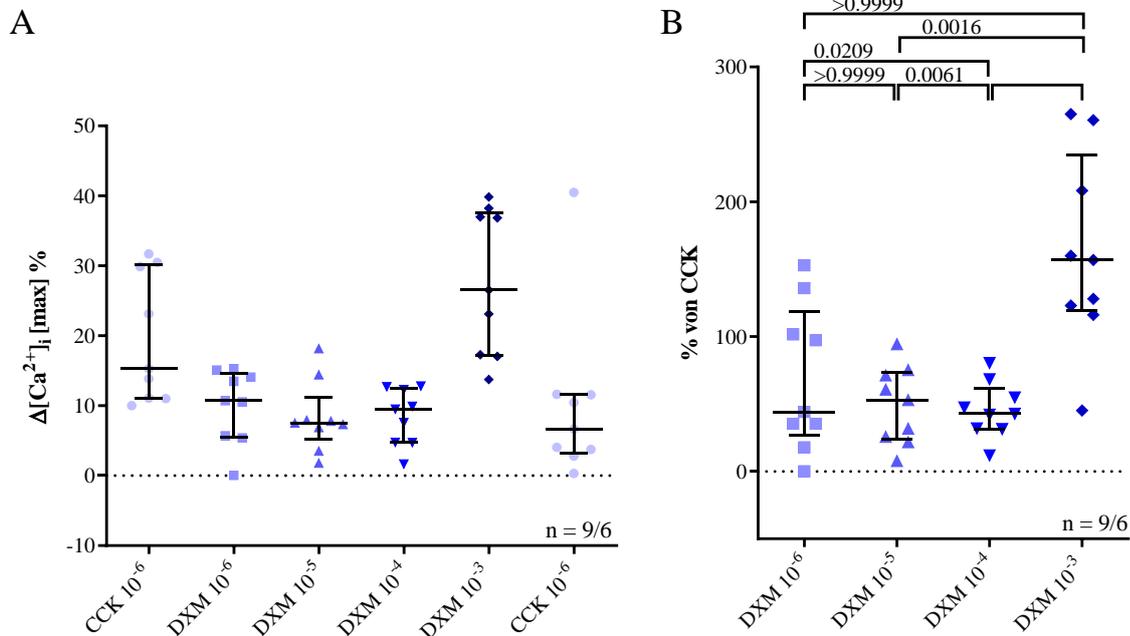


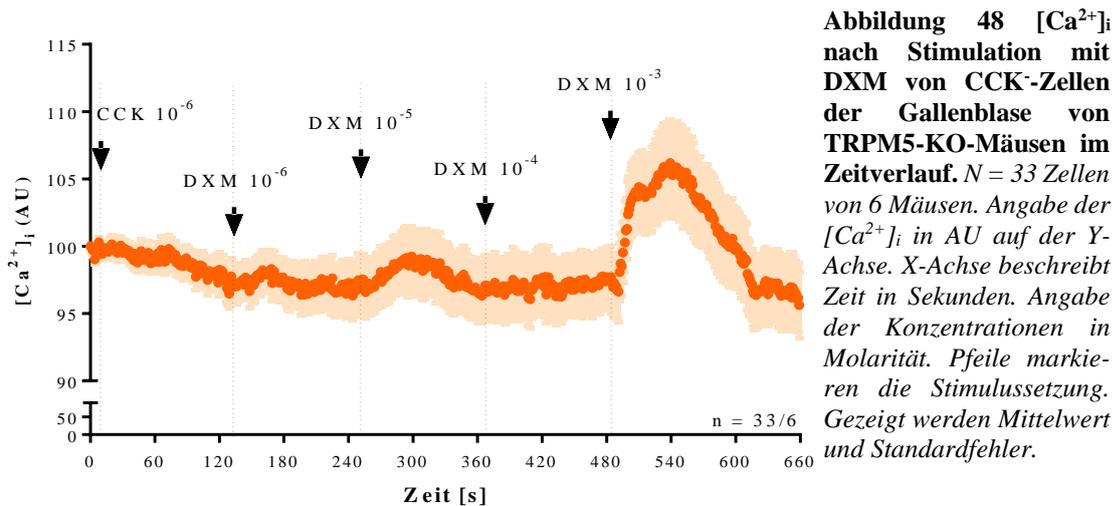
Abbildung 47 (A) Maximale Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ der glatten Muskelzellen der Gallenblase von TRPM5-KO-Mäusen nach Stimulation mit DXM. (B) Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ im Verhältnis zur Antwort auf CCK. Darstellung des Medians mit Interquartilabstand. (A) $N = 9$ Zellen von 6 Mäusen. Maximale Änderung in Prozent. Angabe der Konzentrationen in Molarität. (B) Maximale Reaktion auf DXM in Prozent der maximalen Reaktion auf CCK. $N = 9$ Zellen von 6 Mäusen. Analyse mit Friedman-Test mit Angabe der p-Werte.

Tabelle 29 Analyse mit Friedman-Test. Vergleich der Kalziumreaktionen auf unterschiedliche Konzentrationen DXM mit der Reaktion auf CCK und der Konzentrationen untereinander. Angabe der p-Werte.

	CCK 10^{-6}	DXM 10^{-6}	DXM 10^{-5}	DXM 10^{-4}	DXM 10^{-3}
DXM 10^{-6}	> 0,9999				
DXM 10^{-5}	0,3508	> 0,9999			
DXM 10^{-4}	0,1766	> 0,9999	> 0,9999		
DXM 10^{-3}	> 0,9999	0,0566	0,0039	0,0014	
CCK 10^{-6}	0,3508	> 0,9999	> 0,9999	> 0,9999	0,0039

Um zu testen, ob die Reaktionsausmaße nach Gabe von DXM im Zusammenhang stehen mit den Reaktionsausmaßen auf CCK, wurden die Werte der Anstiege des intrazellulären Kalziums zueinander ins Verhältnis gesetzt (Abbildung 47 B). Dabei zeigte sich ein leicht abweichendes Bild im Vergleich zu den reinen prozentualen Werten. Die Reaktionsaus-

maße im Verhältnis zu CCK lagen für die Konzentrationen DXM 1×10^{-6} M und DXM 1×10^{-4} M im Median bei etwas über 40 % von CCK. Die Werte für die Konzentration DXM 1×10^{-5} M lagen in dem Fall jedoch mit etwa 52 % von CCK im Median etwas höher. Für die Konzentration DXM 1×10^{-3} M zeigten mit einer Ausnahme alle Zellen einen Anstieg von über 100 % von CCK mit einem Median von 157 % von CCK (Abbildung 47 B). Die CCK-relativierte Reaktion auf DXM 1×10^{-3} M zeigte im Friedman-Test signifikante Unterschiede zu allen anderen DXM-Konzentrationen.



Es wurden ebenfalls Messungen an 33 CCK⁻-Zellen aus Gallenblasen von 6 TRPM5-KO-Mäusen durchgeführt (Abbildung 48). Auch bei diesen Zellen zeigte sich der größte Anstieg des intrazellulären Kalziums nach Gabe von DXM 1×10^{-3} M. Auch bei den CCK⁻-Zellen schienen die Reaktionsausmaße in den niedrigen Konzentrationen insgesamt sehr gering auszufallen. Im Wilcoxon-matched-pairs-signed-rank-Test zeigte sich für alle Konzentrationen ein signifikanter Anstieg (Abbildung 49).

Unter den CCK⁻-Zellen wurden insgesamt 67 % als Responder identifiziert (Abbildung 50). Im Vergleich zu den CCK⁺-Zellen fiel auf, dass es unter den CCK⁺-Zellen auf jede DXM-Konzentration mehr Responder unter den CCK⁺-Zellen als unter den CCK⁻-Zellen gab. Im Chi-square-Test zeigten sich dabei jedoch signifikante Unterschiede nur für die Konzentrationen DXM 1×10^{-6} M und DXM 1×10^{-3} M (Abbildung 50).

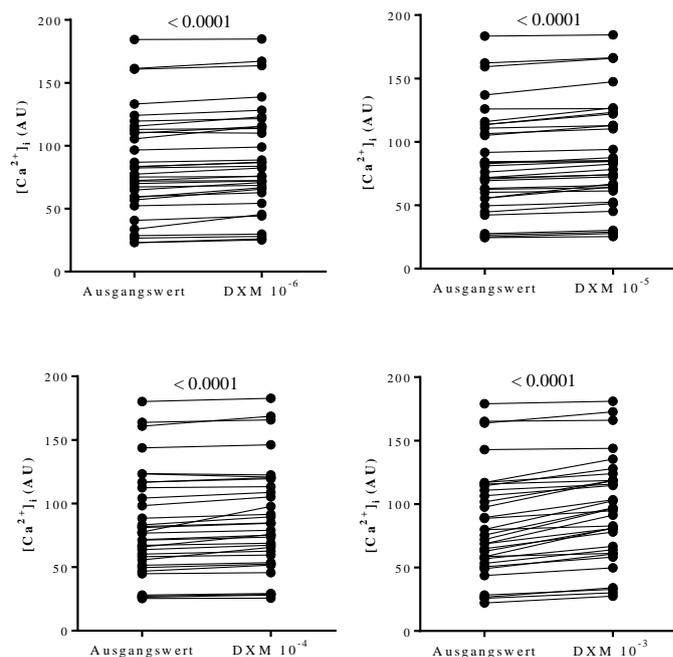


Abbildung 49 $[Ca^{2+}]_i$ vor und nach Stimulation mit DXM in CCK-Zellen der Gallenblasen von TRPM5-KO-Mäusen. Angabe der $[Ca^{2+}]_i$ in AU. Angabe der DXM-Konzentrationen in Molarität. Analyse mittels Wilcoxon-matched-pairs-signed-rank-Test mit Angabe des p-Wertes.

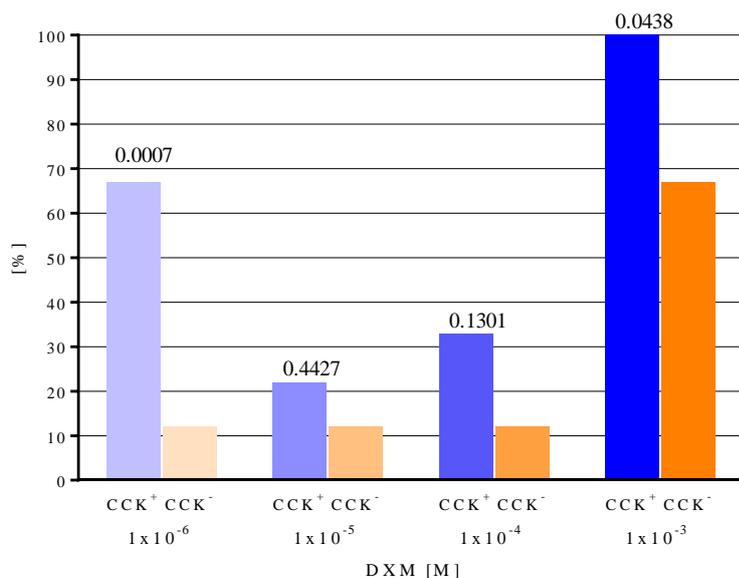
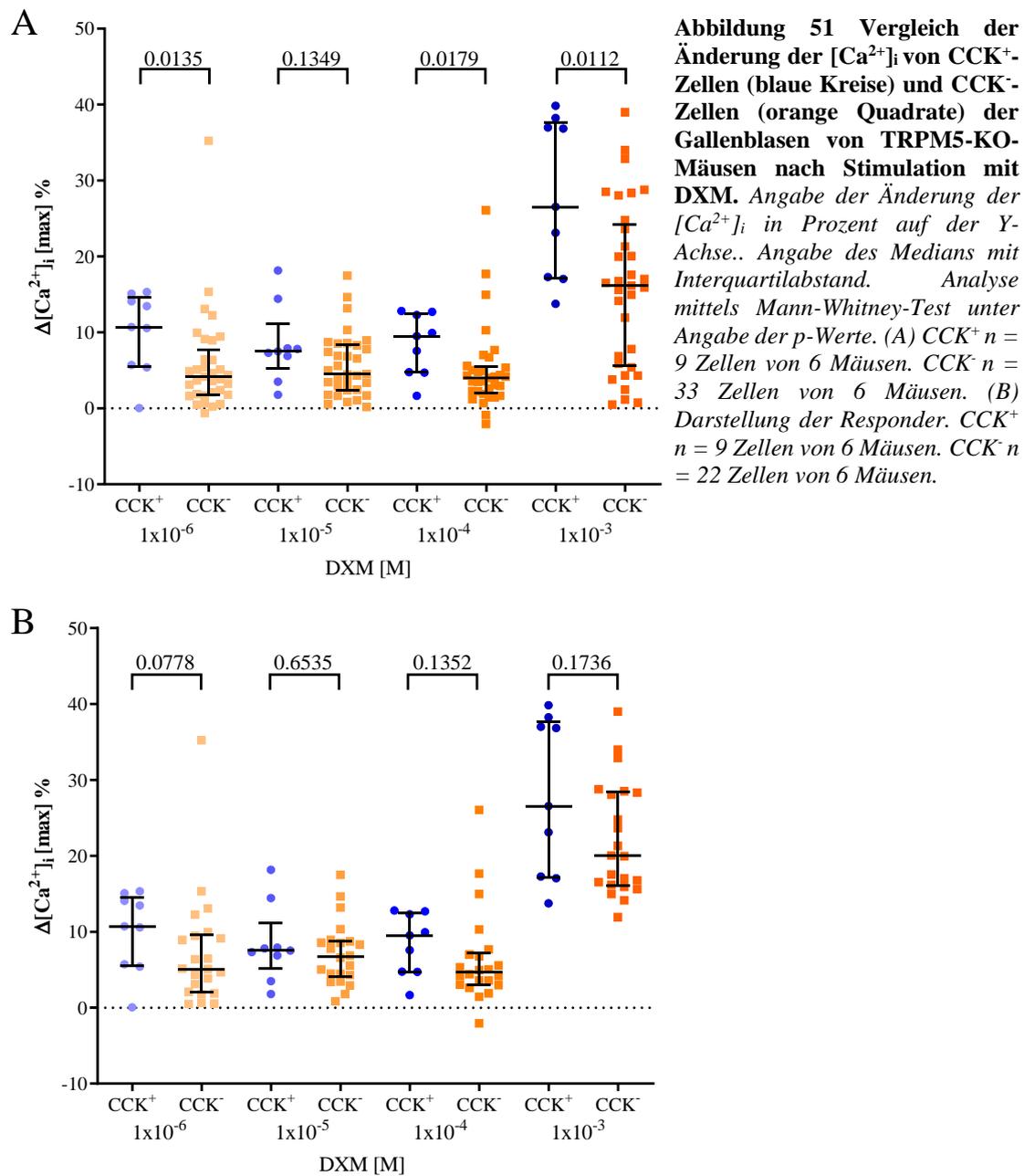


Abbildung 50 Prozentualer Anteil an CCK⁺- (blau) und CCK⁻- (orange) Zellen von TRPM5-KO-Mäusen, die auf die jeweilige Konzentration von DXM mit einem mind. 10 %igen Anstieg reagiert haben (Responder). Analyse mittels Chi-square-Test unter Angabe der p-Werte. CCK⁺ n = 9 Zellen. CCK⁻ n = 22 Zellen.

Im Vergleich zwischen den prozentualen Kalziumanstiegen der CCK⁺-Zellen und der CCK⁻-Zellen (Abbildung 51 A) fiel auf, dass die Reaktionsausmaße der CCK⁺-Zellen im Median für alle Konzentrationen höher waren als die der CCK⁻-Zellen. Für die Konzentrationen DXM 1x10⁻⁶ M, DXM 1x10⁻⁴ M und DXM 1x10⁻³ M ergaben sich im Mann-Whitney-Test signifikante Unterschiede zwischen den Reaktionsausmaßen. Betrachtete man lediglich die Responder, fiel auf, dass die Unterschiede zwischen den CCK⁺-Zellen und den CCK⁻-Zellen weniger, bzw. nicht mehr signifikant waren (Abbildung 51 B). Ob-

wohl weiterhin die CCK⁺-Zellen im Median stärker reagierten als die CCK⁻-Zellen, erschienen diese Unterschiede bei reiner Betrachtung der Responder weniger gravierend.



Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die Reaktionsausmaße sowohl der CCK⁺-Zellen, als auch der CCK⁻-Zellen nach Gabe von niedrigen Konzentrationen DXM sehr gering ausfielen. Einen größeren Effekt schien es für beide Zellarten auf die Konzentration DXM 1×10^{-3} M gegeben zu haben, wobei insgesamt das Reaktionsausmaß der glatten Muskelzellen noch etwas stärker ausfiel. Unter den Respondern war dieser Unterschied im Reaktionsausmaß allerdings schwächer ausgeprägt.

3.5.2 Vergleich der Anstiege des intrazellulären Kalziums nach Gabe von DXM von Zellen der TRPM5-KO-Mäuse zu Zellen von TRPM5-WT-Mäusen

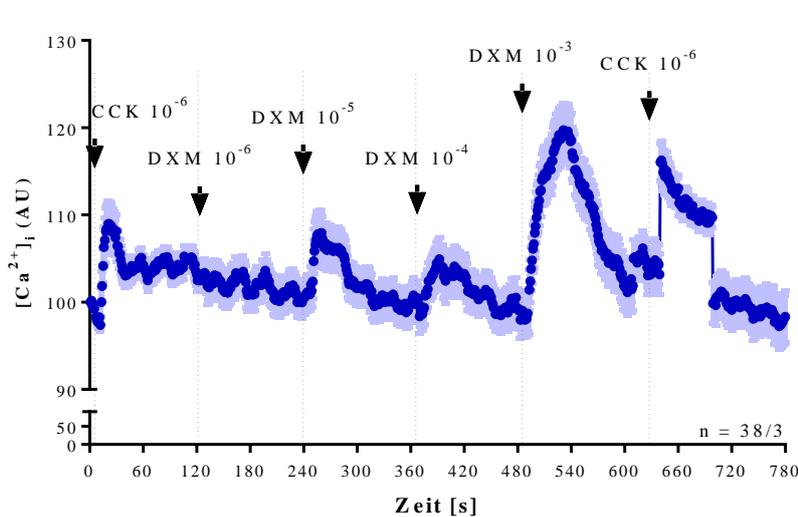


Abbildung 52 $[Ca^{2+}]_i$ der CCK⁺-Zellen der Gallenblase von TRPM5-WT-Mäusen nach Zugabe von DXM im Zeitverlauf. $N = 38$ Zellen von 3 Mäusen. $[Ca^{2+}]_i$ in AU auf der Y-Achse. X-Achse beschreibt Zeit in Sekunden. Konzentrationen in Molarität. Pfeile markieren die Stimulussetzung. Gezeigt werden Mittelwert und Standardfehler.

Parallel zu der Versuchsreihe mit den TRPM5-KO-Mäusen wurden Messungen an entsprechenden Wildtyp-Stämmen durchgeführt. DXM wurde an 38 CCK⁺-Zellen von drei Mäusen getestet. Auf den ersten Blick schienen die CCK⁺-Zellen der TRPM5-WT-Mäuse in den niedrigeren Konzentrationen DXM etwas stärker zu reagieren als die der KO-Mäuse (Abbildung 52). Die Zellen zeigten allerdings zum Teil auch viele spontane Kalziumwellen (Abbildung 52). Im Wilcoxon-matched-pairs-signed-rank-Test ergaben sich für alle Konzentrationen DXM signifikante Anstiege des intrazellulären Kalziums (Abbildung 53).

Im Vergleich der maximalen prozentualen Anstiege des intrazellulären Kalziums zeigte sich auch für die CCK⁺-Zellen der WT-Mäuse der höchste Anstieg nach Gabe von DXM 1×10^{-3} M. Im Vergleich dazu ergaben sich im Friedman-Test signifikante Unterschiede zu allen anderen Konzentrationen, allerdings nicht zu CCK. Der geringste prozentuale Anstieg des intrazellulären Kalziums zeigte sich nach Gabe von DXM 1×10^{-6} M. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zu den Konzentrationen DXM 1×10^{-5} M und DXM 1×10^{-4} M (Abbildung 54 A). Nach Gabe der DXM-Konzentrationsreihe erfolgte eine erneute Gabe von CCK, welche mit 6 % im Median etwa nur noch die Hälfte des ursprünglichen Reaktionsausmaßes von CCK auslöste. Im statistischen Vergleich zeigte sich zwischen den beiden CCK-Gaben ein signifikanter Unterschied (Abbildung 54 A, Tabelle 30). Unter den CCK⁺-Zellen der TRPM5-WT-Mäuse wurden 89 % als Responder

identifiziert. Aufgrund der hohen Zahl an Respondern zeigten sich in der statistischen Auswertung bei der isolierten Betrachtung dieser Zellen kaum Unterschiede im Vergleich zur Grundgesamtheit (Abbildung 54 B, Tabelle 30).

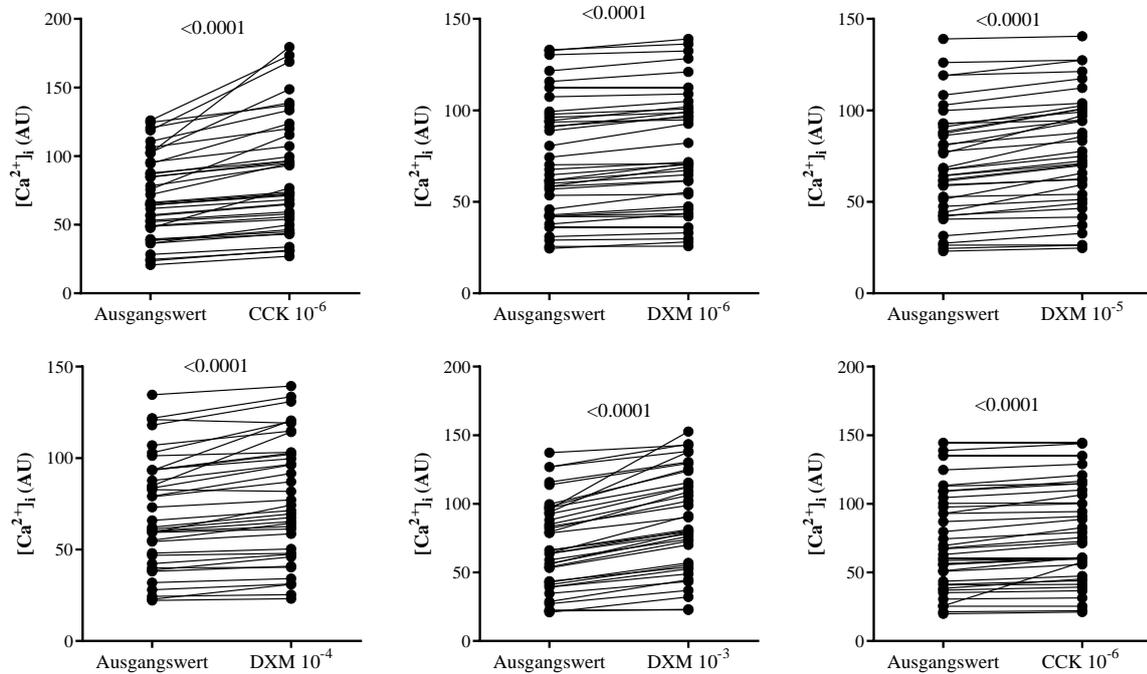


Abbildung 53 $[Ca^{2+}]_i$ vor und nach Stimulation mit CCK oder DXM in glatten Muskelzellen der Gallenblase von TRPM5-WT-Mäusen. Angabe der $[Ca^{2+}]_i$ in AU. Angabe der Konzentrationen in Molarität. Analyse mittels Wilcoxon-matched-pairs-signed-rank-Test mit Angabe des p-Wertes.

Vergleich man nun jedoch die Anzahl der Responder der CCK⁺-Zellen von TRPM5-WT- und TRPM5-KO-Mäusen, fiel auf, dass es auf die DXM-Konzentration 1×10^{-6} M unter den TRPM5-KO-Mäusen deutlich mehr Responder gab als unter den TRPM5-WT-Mäusen (Abbildung 55). Hier ergab sich im Chi-square-Test auch ein signifikanter Unterschied. Im Bereich der höheren DXM-Konzentrationen war dieser signifikante Unterschied allerdings nicht mehr vorhanden.

Im direkten Vergleich zwischen den prozentualen Reaktionsausmaßen der CCK⁺-Zellen der TRPM5-KO- und der WT-Mäuse (Abbildung 56 A) ergab sich im Mann-Whitney-Test für keine der DXM-Konzentrationen ein signifikanter Unterschied. In der Tendenz schien allerdings der Unterschied im Bereich der niedrigeren Konzentrationen etwas größer zu sein als im Bereich der hohen. Betrachtete man wiederum nur die Reaktionsausmaße der Responder, waren die statistischen Unterschiede noch geringer.

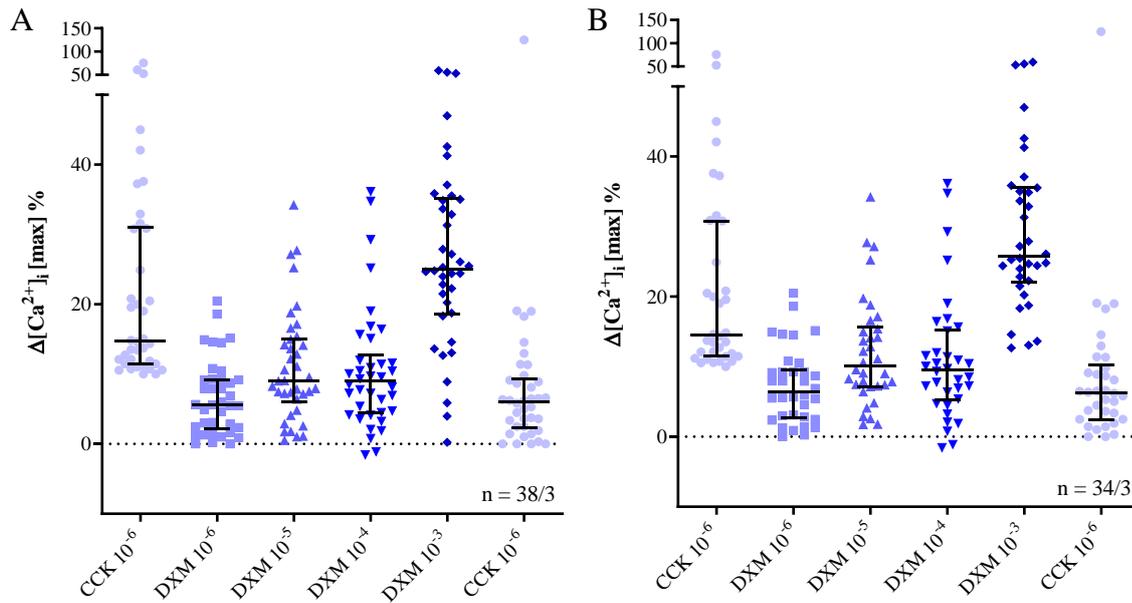


Abbildung 54 Maximale Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ der glatten Muskelzellen der Gallenblase von TRPM5-WT-Mäusen nach Stimulation mit DXM im Vergleich zum Ausgangswert. Darstellung des Medians mit Interquartilabstand. Angabe der Kalziumänderung in Prozent. Angabe der Konzentrationen in Molarität. (A) $N = 38$ Zellen von 3 Mäusen. (B) Darstellung der Responder. $N = 34$ Zellen von 3 Mäusen.

Tabelle 30 Analyse mit Friedman-Test. Angabe der p -Werte, Vergleich der Kalziumreaktionen auf unterschiedliche Konzentrationen DXM mit der Reaktion auf CCK und der Konzentrationen untereinander. Vergleich der Kalziumreaktionen der Responder auf unterschiedliche Konzentrationen DXM untereinander und mit CCK.

	CCK 10^{-6}	DXM 10^{-6}	DXM 10^{-5}	DXM 10^{-4}	DXM 10^{-3}
DXM 10^{-6}	< 0,0001				
DXM 10^{-5}	0,0722	0,1507			
DXM 10^{-4}	0,0004	> 0,9999	> 0,9999		
DXM 10^{-3}	> 0,9999	< 0,0001	0,0001	< 0,0001	
CCK 10^{-6}	< 0,0001	> 0,9999	0,1507	> 0,9999	< 0,0001
Responder					
DXM 10^{-6}	< 0,0001				
DXM 10^{-5}	0,4872	0,0975			
DXM 10^{-4}	0,0015	> 0,9999	> 0,9999		
DXM 10^{-3}	0,2071	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	
CCK 10^{-6}	< 0,0001	> 0,9999	0,1184	> 0,9999	< 0,0001

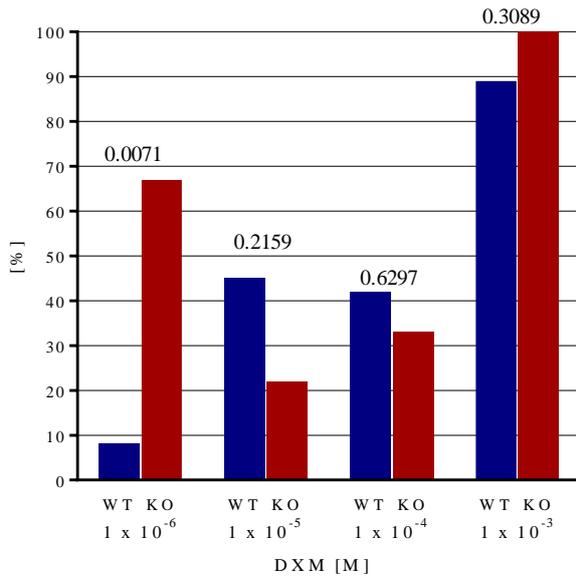


Abbildung 55 Prozentualer Anteil an CCK⁺-Zellen von TRPM5-WT- (blau) und TRPM5-KO-Mäusen (rot), die auf die jeweilige Konzentration von DXM mit einem mind. 10 %igen Anstieg reagiert haben (Responder). Analyse mittels Chi-square-Test unter Angabe der p-Werte. TRPM5-KO n = 9 Zellen. TRPM5-WT n = 34 Zellen.

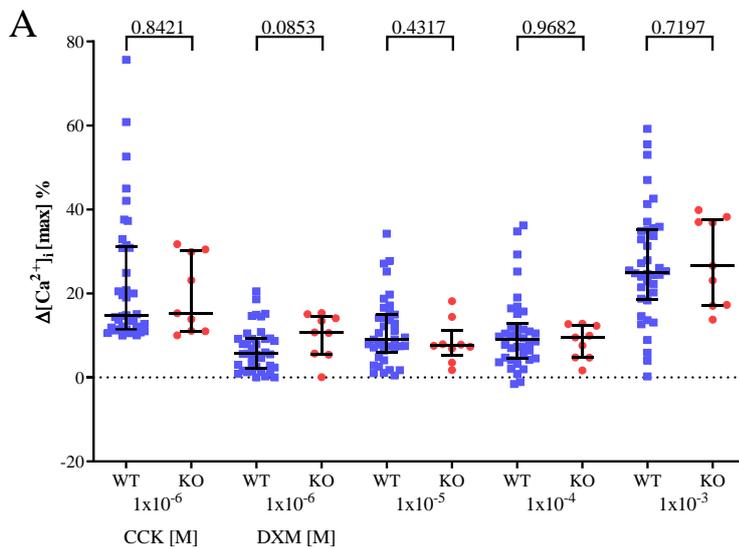
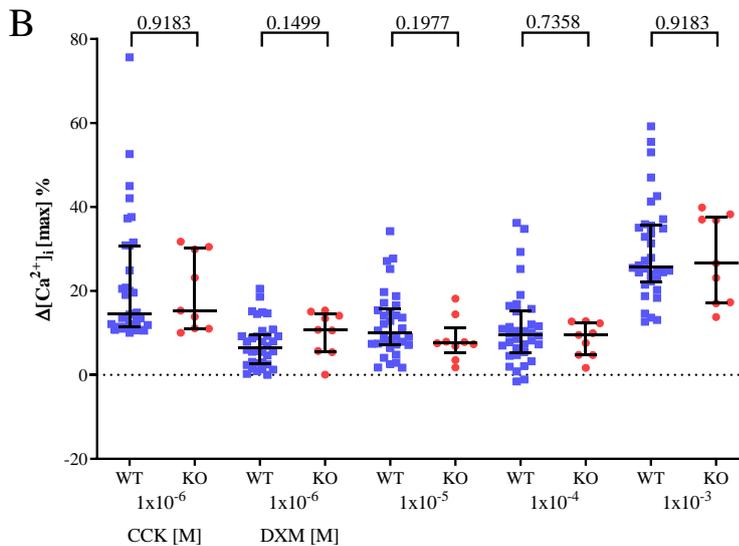


Abbildung 56 Vergleich der Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ von CCK⁺-Zellen der Gallenblase von TRPM5-WT- (blaue Quadrate) und KO-Mäusen (rote Kreise) nach Stimulation mit DXM. Angabe der Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ in Prozent auf der Y-Achse. Angabe des Medians mit Interquartilabstand. Analyse mittels Mann-Whitney-Test unter Angabe der p-Werte. (A) TRPM5-WT n = 38 Zellen von 3 Mäusen. TRPM5-KO n = 9 Zellen von 6 Mäusen. (B) Darstellung der Responder. TRPM5-WT n = 34 Zellen von 3 Mäusen. TRPM5-KO n = 9 Zellen von 6 Mäusen.



Selbst für die Konzentration DXM 1×10^{-6} M lag der p-Wert im Mann-Whitney-Test für die Responder bei 0,1499. Obwohl die Responder der TRPM5-KO-Mäuse denen der TRPM5-WT-Mäuse insbesondere im niedrigen DXM-Bereich zahlenmäßig relativ betrachtet deutlich überlegen waren, spiegelte sich dies im Reaktionsausmaß der Zellen nicht wider (Abbildung 56 B). Dieser Eindruck bestätigte sich auch im Vergleich zwischen den Reaktionsausmaßen in Prozent von CCK (Abbildung 57 A). Auch hier ergab sich im Mann-Whitney-Test für keine Konzentration ein signifikanter Unterschied, weder für die Grundgesamtheit der Zellen, noch für die isoliert betrachteten Responder (Abbildung 57 B).

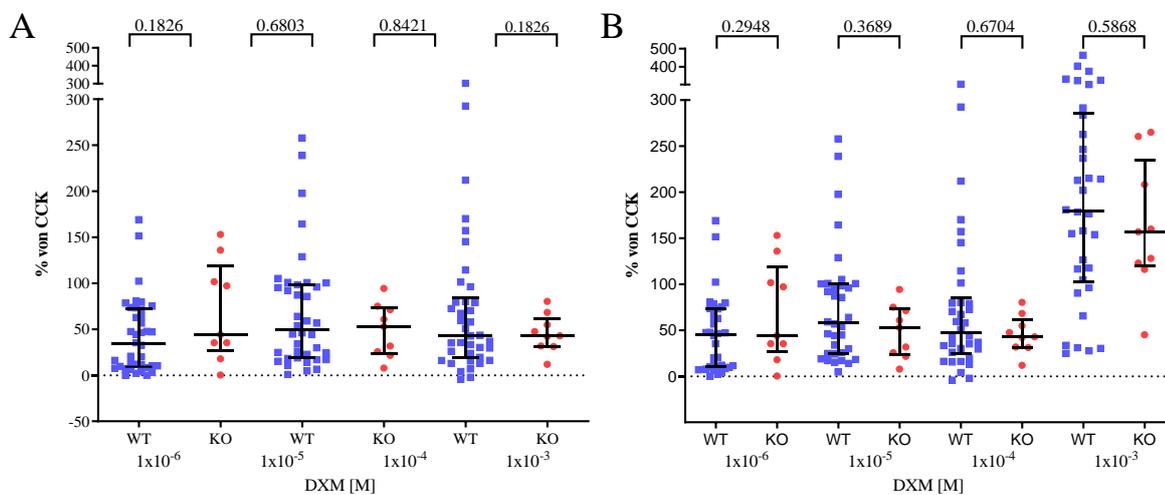


Abbildung 57 Vergleich der Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ der glatten Muskelzellen der Gallenblase von TRPM5-KO- und WT-Mäusen nach Stimulation mit DXM im Verhältnis zur Antwort auf CCK. Darstellung des Medians mit Interquartilabstand. Maximale Reaktion auf DXM in Prozent der maximalen Reaktion auf CCK. Analyse mit Mann-Whitney-Test mit Angabe der p-Werte. (A) TRPM5-WT $n = 38$ Zellen von 3 Mäusen. TRPM5-KO $n = 9$ Zellen von 6 Mäusen. (B) Darstellung der Responder. TRPM5-WT $n = 34$ Zellen von 3 Mäusen. TRPM5-KO $n = 9$ Zellen von 6 Mäusen.

Es wurden ebenfalls Messungen an 67 CCK⁻-Zellen der Gallenblasen von insgesamt 3 TRPM5-WT-Mäusen durchgeführt. Dabei zeigte sich ein konzentrationsabhängiger Anstieg des intrazellulären Kalziums nach DXM-Gabe mit dem höchsten Anstieg nach Gabe von DXM 1×10^{-3} M (Abbildung 58). Im Wilcoxon-matched-pairs-signed-rank-Test ergaben sich für alle Konzentrationen signifikante Anstiege (Abbildung 59).

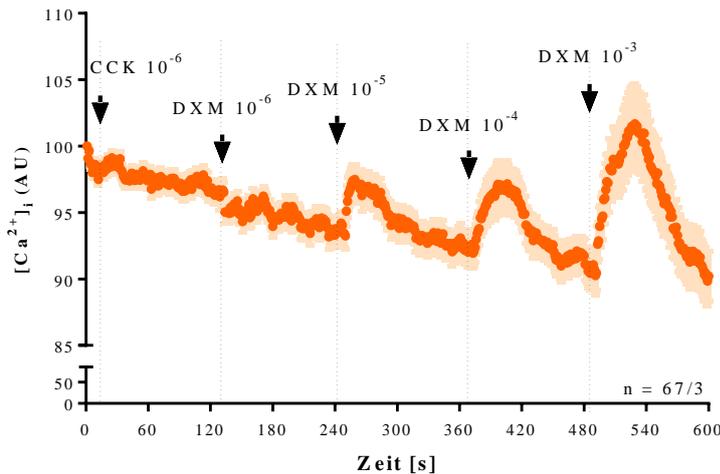


Abbildung 58 $[Ca^{2+}]_i$ nach Stimulation mit DXM von CCK-Zellen der Gallenblase von TRPM5-WT-Mäusen im Zeitverlauf. $N = 67$ Zellen von 3 Mäusen. Angabe der $[Ca^{2+}]_i$ in AU auf der Y-Achse. X-Achse beschreibt Zeit in Sekunden. Angabe der Konzentrationen in Molarität. Pfeile markieren die Stimulussetzung. Gezeigt werden Mittelwert und Standardfehler.

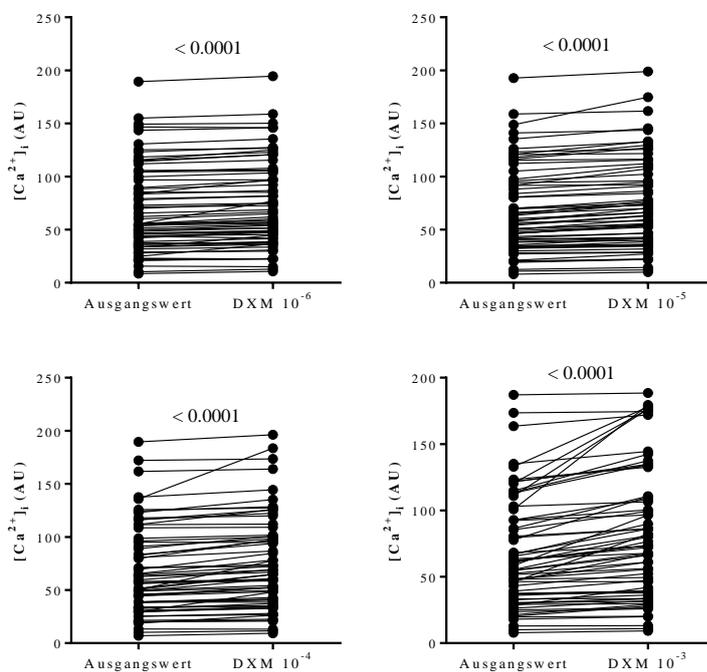


Abbildung 59 $[Ca^{2+}]_i$ vor und nach Stimulation mit DXM in CCK-Zellen der Gallenblase von TRPM5-WT-Mäusen. Angabe der $[Ca^{2+}]_i$ in AU. Angabe der Konzentrationen in Molarität. Analyse mittels Wilcoxon-matched-pairs-signed-rank-Test mit Angabe des p -Wertes.

Unter den CCK-Zellen der TRPM5-WT-Mäuse wurden 74 % als Responder identifiziert. Verglichen mit den CCK-Zellen der TRPM5-KO-Mäuse gab es auf die DXM-Konzentrationen 1×10^{-5} M und 1×10^{-4} M signifikant mehr Responder unter den Zellen der WT-Mäuse als unter den Zellen der KO-Mäuse. Die Analyse erfolgte mittels Chi-square-Test (Abbildung 60). Im Bereich der DXM-Konzentrationen 1×10^{-6} M und 1×10^{-3} M gab es zwischen den Mausstämmen keine signifikanten Unterschiede. Dieses Bild spiegelte sich auch im Vergleich der prozentualen Reaktionsausmaße des intrazellulären Kalziums wider.

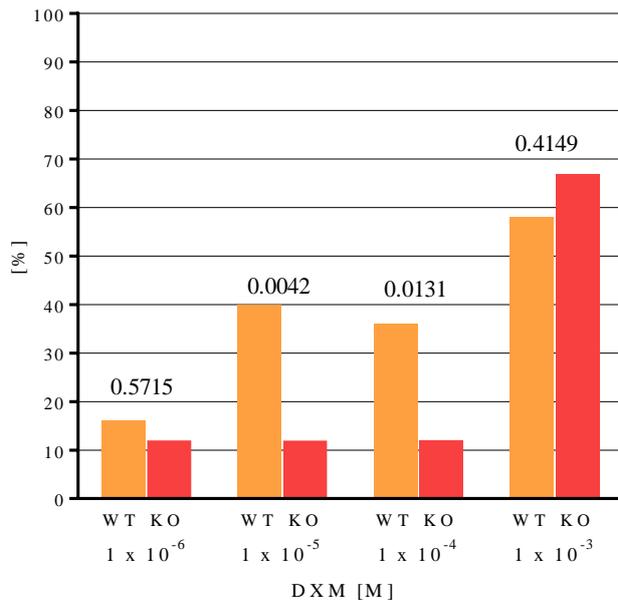


Abbildung 60 Prozentualer Anteil an CCK⁻-Zellen von TRPM5-WT- (orange) und TRPM5-KO-Mäusen (rot), die auf die jeweilige Konzentration von DXM mit einem mind. 10 %igen Anstieg reagiert haben (Responder). Analyse mittels Chi-square-Test unter Angabe der p-Werte. TRPM5-KO n = 22 Zellen. TRPM5-WT n = 50 Zellen.

Während sich für die CCK⁺-Zellen zwischen den TRPM5-KO- und WT-Mäusen kein Unterschied im prozentualen Reaktionsausmaß zeigte, schien es unter den CCK⁻-Zellen etwas anders zu sein. Hier zeigten sich für die Konzentrationen DXM 1×10^{-5} M und 1×10^{-4} M im Mann-Whitney-Test signifikante Unterschiede zwischen den beiden Mausstämmen (Abbildung 61 A). Nach Gabe von DXM 1×10^{-5} M stieg das intrazelluläre Kalzium in den CCK⁻-Zellen der WT-Mäuse im Median um etwa 8 %. Die gleiche Konzentration DXM bewirkte in den CCK⁻-Zellen der KO-Mäuse lediglich einen Anstieg von 4 %. So ähnlich verhielt es sich auch für die Konzentration DXM 1×10^{-4} M. Sowohl für die niedrigste Konzentration DXM 1×10^{-6} M, als auch für die höchste DXM 1×10^{-3} M ergaben sich zwischen den Zellen der WT- und KO-Mäuse keine signifikanten Unterschiede. Verglich man lediglich die Reaktionsausmaße der Responder miteinander (Abbildung 61 B), waren die statistischen Unterschiede der Reaktionsausmaße sogar eher noch etwas geringer, wobei sie in den beiden mittleren Konzentrationen mit p-Werten von 0,0068 und 0,0115 im Mann-Whitney-Test weiterhin signifikant waren. Im Bereich der DXM-Konzentrationen 1×10^{-6} M und 1×10^{-3} M gab es zwischen den Mausstämmen keine signifikanten Unterschiede. Dieses Bild spiegelte sich auch im Vergleich der prozentualen Reaktionsausmaße des intrazellulären Kalziums wider. Während sich für die CCK⁺-Zellen zwischen den TRPM5-KO- und WT-Mäusen kein Unterschied im prozentualen Reaktionsausmaß zeigte, schien es unter den CCK⁻-Zellen etwas anders zu sein. Hier zeigten sich für die Konzentrationen DXM 1×10^{-5} M und 1×10^{-4} M im Mann-Whitney-Test signifikante Unterschiede zwischen den beiden Mausstämmen.

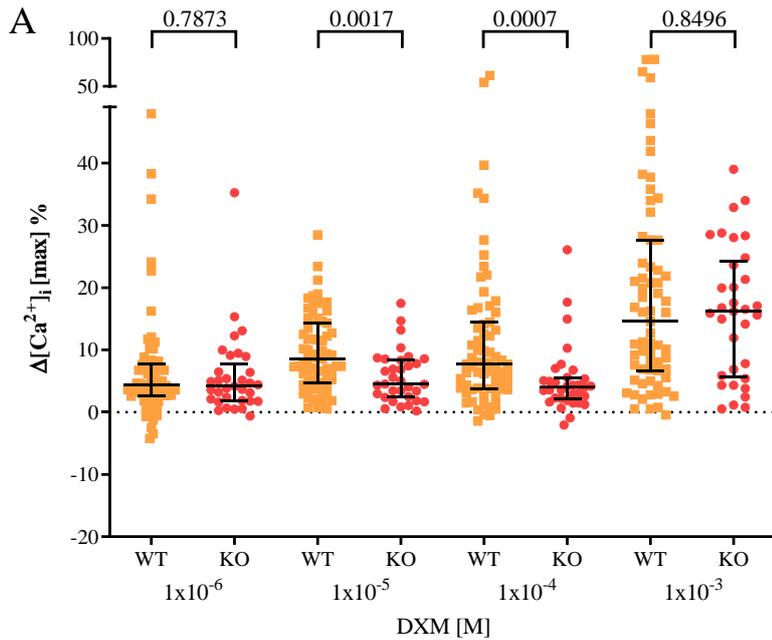
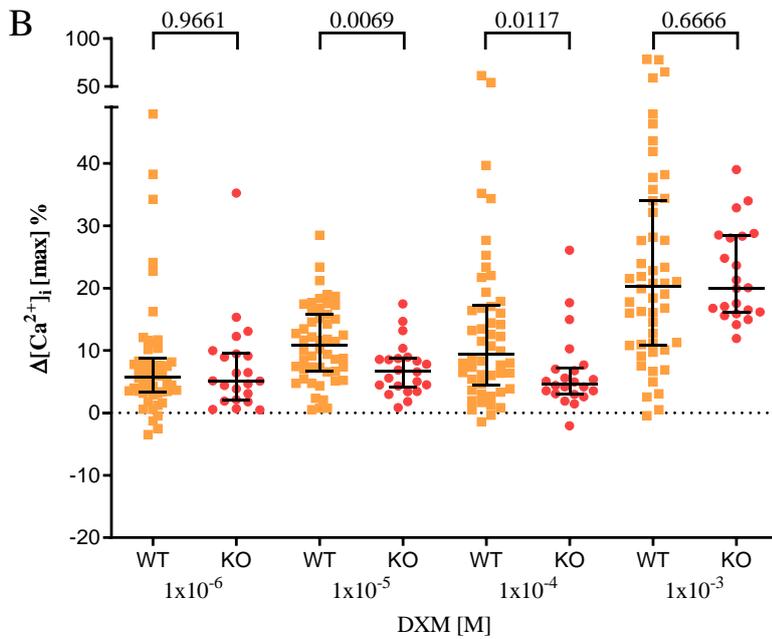


Abbildung 61 Vergleich der Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ von CCK-Zellen der Gallenblase von TRPM5-WT- (orange Quadrate) und KO-Mäusen (rote Kreise) nach Stimulation mit DXM. Angabe der Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ in Prozent auf der Y-Achse. Angabe des Medians mit Interquartilabstand. Analyse mittels Mann-Whitney-Test unter Angabe der p-Werte. (A) TRPM5-WT $n = 67$ Zellen von 3 Mäusen. TRPM5-KO $n = 33$ Zellen von 6 Mäusen. (B) Darstellung der Responder. TRPM5-WT $n = 50$ Zellen von 3 Mäusen. TRPM5-KO $n = 22$ Zellen von 6 Mäusen.



Nach Gabe von DXM 1×10^{-5} M stieg das intrazelluläre Kalzium in den CCK⁻-Zellen der WT-Mäuse im Median um etwa 8 %. Die gleiche Konzentration DXM bewirkte in den CCK⁻-Zellen der KO-Mäuse lediglich einen Anstieg von 4 %. So ähnlich verhielt es sich auch für die Konzentration DXM 1×10^{-4} M. Sowohl für die niedrigste Konzentration DXM 1×10^{-6} M, als auch für die höchste DXM 1×10^{-3} M ergaben sich zwischen den Zellen der WT- und KO-Mäuse keine signifikanten Unterschiede. Vergleicht man lediglich die Reaktionsausmaße der Responder miteinander (Abbildung 61 B), waren die statistischen Unterschiede der Reaktionsausmaße sogar eher noch etwas geringer, wobei sie in

den beiden mittleren Konzentrationen mit p-Werten von 0,0068 und 0,0115 im Mann-Whitney-Test weiterhin signifikant waren.

Zusammenfassend lässt sich für den Vergleich zwischen den Zellen der TRPM5-WT- und KO-Mäuse also sagen, dass die genetischen Veränderungen für die Reaktionsausmaße der CCK⁺-Zellen nach DXM-Gabe keinen wesentlichen Unterschied bewirkten, während in den CCK⁻-Zellen in der Tendenz die Zellen der WT-Mäuse stärker reagierten als die der KO-Mäuse. Gründe hierfür müssen weiter diskutiert werden.

3.5.3 Messungen des intrazellulären Kalziums nach Gabe von Quinin an Zellen der Gallenblase von TRPM5-KO-Mäusen

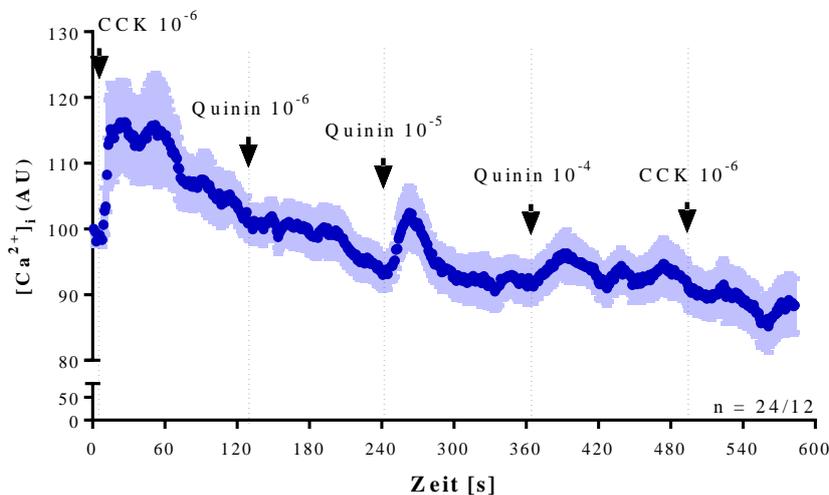


Abbildung 62 $[Ca^{2+}]_i$ der CCK⁺-Zellen der Gallenblase von TRPM5-KO-Mäusen nach Zugabe von Quinin im Zeitverlauf. N = 24 Zellen von 12 Mäusen. Angabe der $[Ca^{2+}]_i$ in AU auf der Y-Achse. X-Achse beschreibt Zeit in Sekunden. Angabe der Konzentrationen in Molarität. Pfeile markieren die Stimulussetzung. Gezeigt werden Mittelwert und Standardfehler.

Es wurden insgesamt 24 CCK⁺-Zellen von 12 TRPM5-KO-Mäusen mit Quinin in aufsteigender Konzentration stimuliert. Dabei zeigten sich geringe Anstiege des intrazellulären Kalziums ohne klare Konzentrationsabhängigkeit (Abbildung 62). Einige der Zellen zeigten verzögerte Anstiege des intrazellulären Kalziums, andere zeigten auch spontane Kalziumwellen (Abbildung 62). Es zeigten sich nach Gabe aller Konzentrationen Quinin im Wilcoxon-matched-pairs-signed-rank-Test signifikante Anstiege des intrazellulären Kalziums (Abbildung 63).

Im Vergleich der maximalen prozentualen Anstiege des intrazellulären Kalziums zeigten sich im Friedman-Test zwischen den Reaktionsausmaßen nach Gabe der unterschiedlichen Konzentrationen Quinin keine signifikanten Unterschiede. Lediglich im Vergleich zu CCK zeigten die Reaktionsausmaße nach allen Konzentrationen von Quinin signifikante Unterschiede.

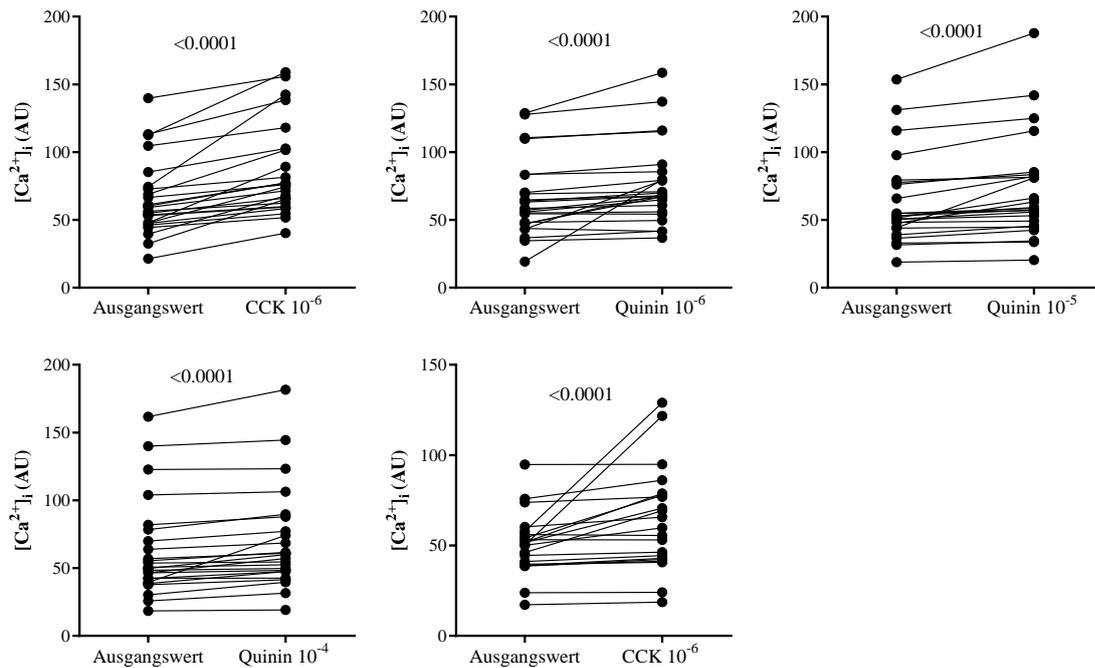


Abbildung 63 $[Ca^{2+}]_i$ vor und nach Stimulation mit CCK oder Quinin in glatten Muskelzellen der Gallenblase von TRPM5-KO-Mäusen. Angabe der $[Ca^{2+}]_i$ in AU. Angabe der Konzentrationen in Molarität. Analyse mittels Wilcoxon-matched-pairs-signed-rank-Test mit Angabe des p-Wertes.

Das höchste Reaktionsausmaß zeigte sich nach Gabe von Quinin 1×10^{-5} M mit etwa 9 % im Median. Der prozentuale Anstieg des intrazellulären Kalziums nach der zweiten Gabe von CCK am Ende der Konzentrationsreihe betrug im Median nur noch etwa 10 %, was etwa der Hälfte des Reaktionsausmaßes nach der ersten Gabe CCK entsprach. Im Vergleich zwischen den beiden CCK-Gaben ergab sich im Friedman-Test ein signifikanter Unterschied (Abbildung 64 A, Tabelle 31). Obwohl die Reaktionsausmaße auf Quinin insgesamt gering ausfielen, wurden 87 % der CCK⁺-Zellen als Responder identifiziert. Signifikante Unterschiede zwischen den Reaktionsausmaßen auf die unterschiedlichen Quinin-Konzentrationen bestanden im Friedman-Test jedoch auch bei isolierter Betrachtung der Responder nicht (Abbildung 64 B, Tabelle 31).

Um zu überprüfen, ob ein Zusammenhang zwischen den Reaktionsausmaßen nach CCK-Gabe und denen nach Quinin-Gabe bestand, wurden die Werte zueinander ins Verhältnis gesetzt (Abbildung 65 A). Dabei zeigte sich, dass bei allen Quinin-Konzentrationen die Werte im Median alle unter 50 % von CCK lagen. Dies änderte sich auch nicht bei isolierter Betrachtung der Responder (Abbildung 65 B).

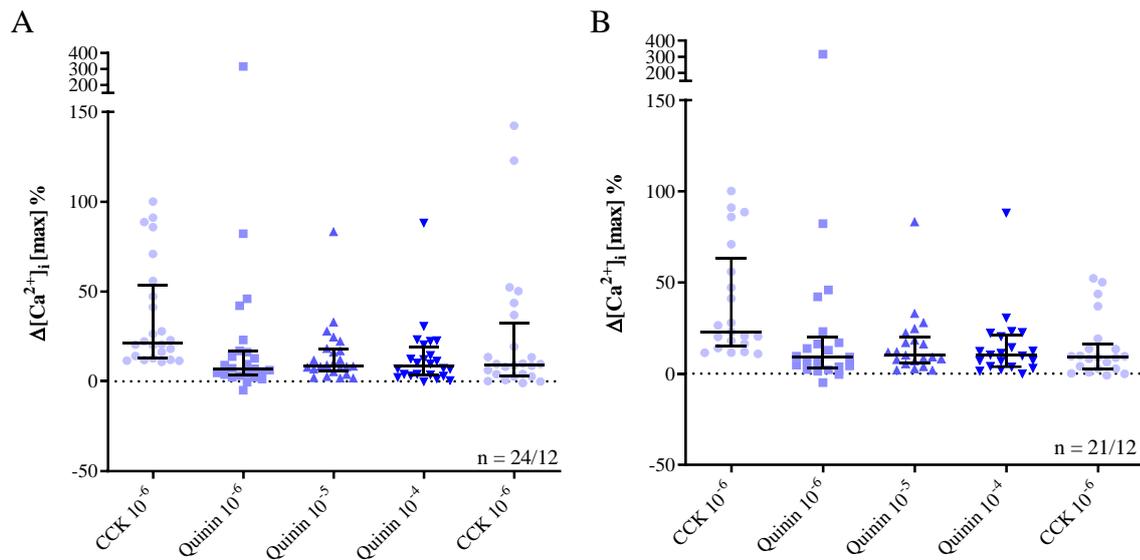


Abbildung 64 Maximale Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ der glatten Muskelzellen der Gallenblase von TRPM5-KO-Mäusen nach Stimulation mit Quinin. Maximale Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ nach Stimulusgabe im Verhältnis zum Ausgangswert. Darstellung des Medians mit Interquartilabstand. Angabe der Kalziumänderung in Prozent. Angabe der Konzentrationen in Molarität. (A) $N = 24$ Zellen von 12 Mäusen. (B) Darstellung der Responder. $N = 21$ Zellen von 12 Mäusen.

Tabelle 31 Analyse mit Friedman-Test. Vergleich der Kalziumreaktionen auf unterschiedliche Konzentrationen Quinin mit der Reaktion auf CCK und der Konzentrationen untereinander. Angabe der p -Werte. Vergleich der Reaktionen der Responder mit Friedman-Test.

	CCK 10^{-6}	Quinin 10^{-6}	Quinin 10^{-5}	Quinin 10^{-4}
Quinin 10^{-6}	0,0026			
Quinin 10^{-5}	0,0467	> 0,9999		
Quinin 10^{-4}	0,0141	> 0,9999	> 0,9999	
CCK 10^{-6}	0,0192	> 0,9999	> 0,9999	> 0,9999
Responder				
Quinin 10^{-6}	0,0129			
Quinin 10^{-5}	0,1473	> 0,9999		
Quinin 10^{-4}	0,0844	> 0,9999	> 0,9999	
CCK 10^{-6}	0,0064	> 0,9999	> 0,9999	> 0,9999

Um die Effekte von Quinin auf die glatten Muskelzellen vergleichen zu können, wurden ebenfalls Messungen an CCK⁻-Zellen durchgeführt. Dabei zeigte sich insgesamt ein sehr niedriges Reaktionsausmaß (Abbildung 66) mit nur sehr leichten, teils verzögerten Anstiegen des intrazellulären Kalziums und einigen spontanen Kalziumwellen. Dennoch zeigten sich im Wilcoxon-matched-pairs-signed-rank-Test für alle Quinin-Konzentrationen signifikante Anstiege (Abbildung 67). Unter den CCK⁻-Zellen wurden

nach Stimulation mit Quinin 42 % als Responder identifiziert, also relativ betrachtet etwa die Hälfte im Vergleich zu den CCK⁺-Zellen.

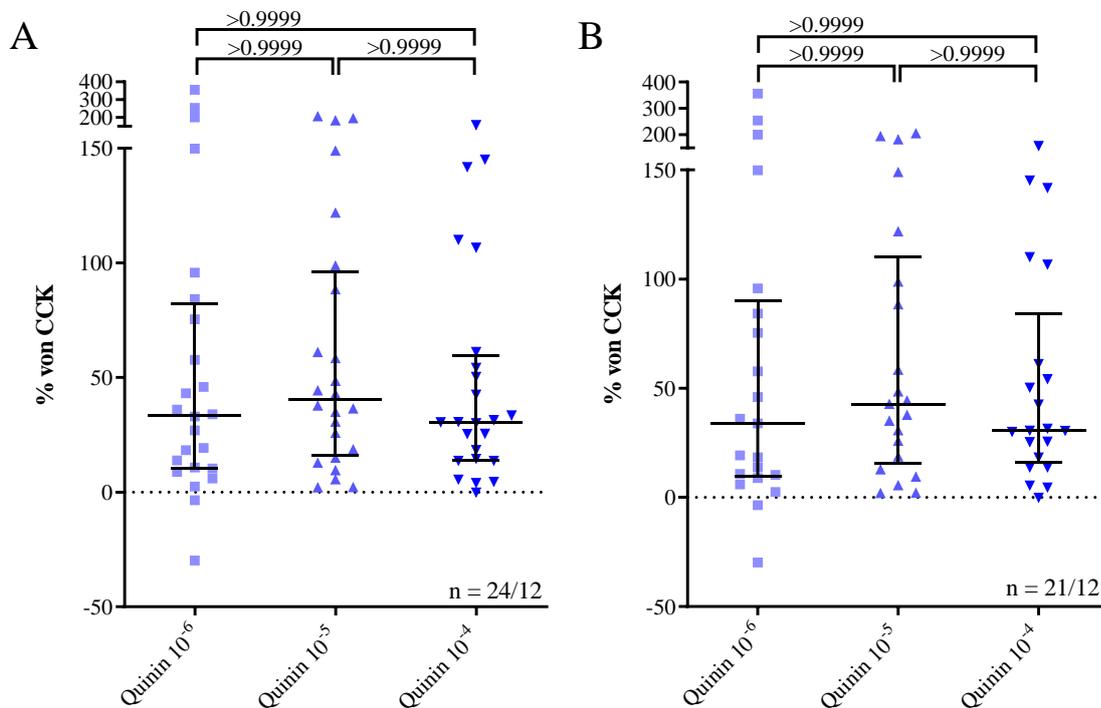


Abbildung 65 Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ der glatten Muskelzellen der Gallenblase von TRPM5-KO-Mäusen nach Stimulation mit Quinin im Verhältnis zur Antwort auf CCK. Darstellung des Medians mit Interquartilabstand. Maximale Reaktion auf Quinin in Prozent der maximalen Reaktion auf CCK. Analyse mit Friedman-Test mit Angabe der p-Werte. (A) N = 24 Zellen von 12 Mäusen. (B) Darstellung der Responder. N = 21 Zellen von 12 Mäusen.

Bei Betrachtung der einzelnen Quinin-Konzentrationen ergab sich jedoch im Chi-square-Test zwischen den CCK⁺-Zellen und den CCK⁻-Zellen lediglich für die Konzentration Quinin 1x10⁻⁴ M ein signifikanter Unterschied in der relativen Anzahl der Responder zugunsten der CCK⁺-Zellen (Abbildung 68).

Im Vergleich zwischen den prozentualen Reaktionsausmaßen der CCK⁺-Zellen und der CCK⁻-Zellen fiel auf, dass zwar für beide Zellarten die Anstiege des intrazellulären Kalziums nach Gabe von Quinin gering waren, jedoch die CCK⁺-Zellen, wie auch schon bei DXM, in der Tendenz noch etwas stärker reagierten als die CCK⁻-Zellen (Abbildung 69 A). Im Mann-Whitney-Test ergaben sich signifikante Unterschiede für die Konzentrationen Quinin 1x10⁻⁵ M und Quinin 1x10⁻⁴ M. Auffällig war dabei, dass die p-Werte mit steigender Konzentration immer kleiner wurden je höher die Quinin-Konzentration war, die gegeben wurde. Während in den CCK⁺-Zellen das intrazelluläre Kalzium mit steigender Konzentration Quinin eher stärker anzusteigen schien, nahm das

Reaktionsausmaß in den CCK⁻-Zellen eher immer weiter ab (Abbildung 69 A). Betrachtete man allerdings die Responder wieder isoliert, waren die zuvor noch beobachteten signifikanten Unterschiede, insbesondere im Bereich der höheren Quinin-Konzentrationen nicht mehr vorhanden (Abbildung 69 B).

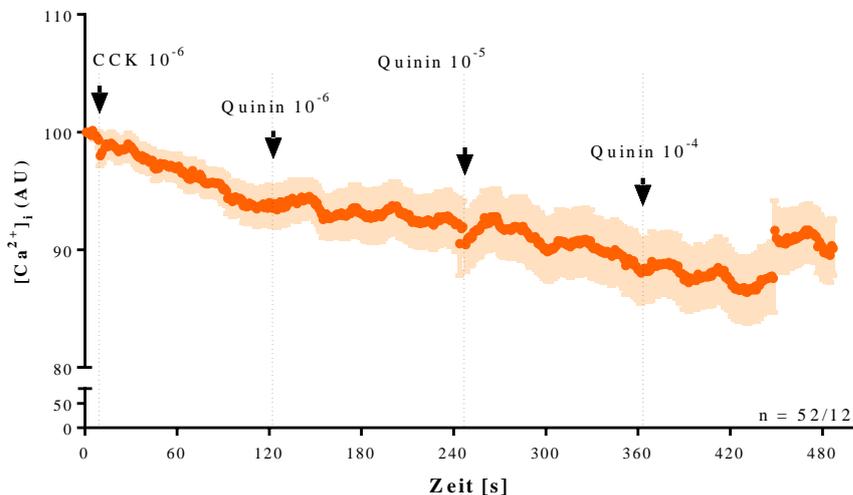


Abbildung 66 $[Ca^{2+}]_i$ nach Stimulation mit Quinin von CCK⁻-Zellen der Gallenblase von TRPM5-KO-Mäusen im Zeitverlauf. $N = 52$ Zellen von 12 Mäusen. Angabe der $[Ca^{2+}]_i$ in AU auf der Y-Achse. X-Achse beschreibt Zeit in Sekunden. Angabe der Konzentrationen in Molarität. Pfeile markieren die Stimulussetzung. Gezeigt werden Mittelwert und Standardfehler.

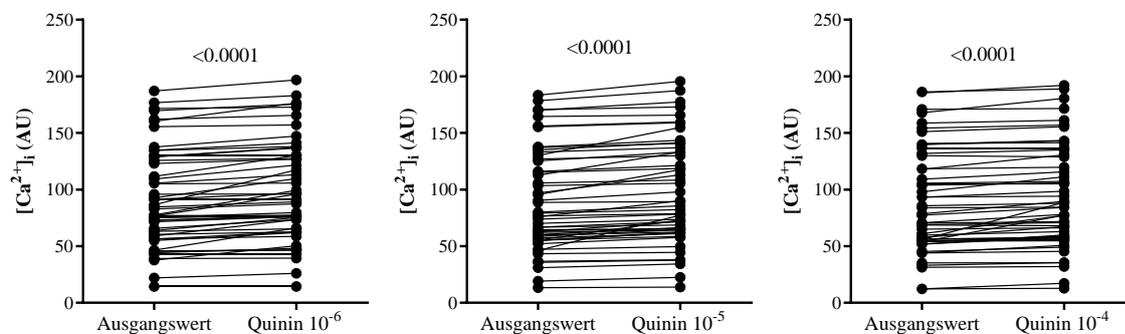


Abbildung 67 $[Ca^{2+}]_i$ vor und nach Stimulation mit Quinin in CCK⁻-Zellen der Gallenblasen von TRPM5-KO-Mäusen. Messung mittels CLSM. Angabe der $[Ca^{2+}]_i$ in AU. Angabe der Quinin-Konzentrationen in Molarität. Analyse mittels Wilcoxon-matched-pairs-signed-rank-Test mit Angabe des p -Wertes.

Zusammenfassend ließ sich also sagen, dass die Reaktionen der CCK⁺-Zellen der Gallenblasen von TRPM5-KO-Mäusen auf Quinin insgesamt zwar recht gering ausfielen, im Vergleich zu den CCK⁻-Zellen jedoch in der Tendenz etwas stärker ausgeprägt waren. Außerdem zeigte sich in der Tendenz auch eine etwas stärkere Reaktion der CCK⁺-Zellen auf die hohen Konzentrationen Quinin, wobei sich keine signifikanten Unterschiede

zeigten. Bei isolierter Betrachtung der Reaktionsausmaße der Responder, ließ sich kaum noch ein Unterschied feststellen.

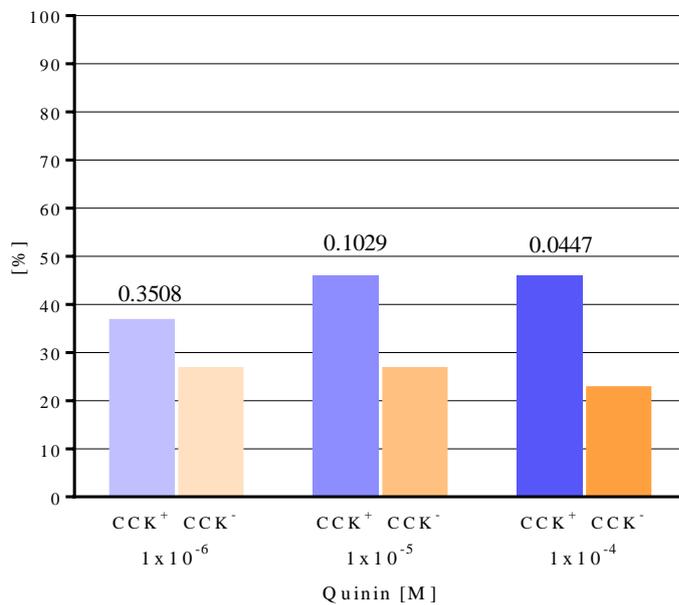


Abbildung 68 Prozentualer Anteil an CCK⁺- (blau) und CCK⁻- (orange) Zellen von TRPM5-KO-Mäusen, die auf die jeweilige Konzentration von Quinin mit einem mind. 10 %igen Anstieg reagiert haben (Responder). Analyse mittels Chi-square-Test unter Angabe der p-Werte. CCK⁺ n = 21 Zellen. CCK⁻ n = 22 Zellen.

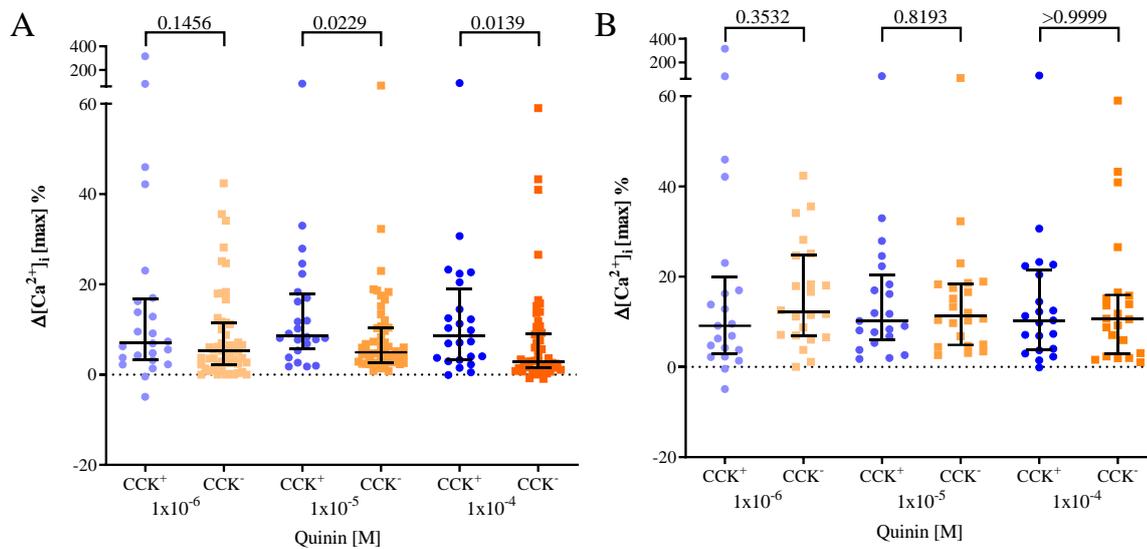


Abbildung 69 Vergleich der Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ von CCK⁺-Zellen (blaue Kreise) und CCK⁻-Zellen (orange Quadrate) der Gallenblasen von TRPM5-KO-Mäusen nach Stimulation mit Quinin. Angabe der Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ in Prozent auf der Y-Achse. Angabe des Medians mit Interquartilabstand. Analyse mittels Mann-Whitney-Test unter Angabe der p-Werte. (A) CCK⁺ n = 24 Zellen von 12 Mäusen. CCK⁻ n = 52 Zellen von 12 Mäusen. (B) Darstellung der Responder. CCK⁺ n = 21 Zellen von 12 Mäusen. CCK⁻ n = 22 Zellen von 12 Mäusen.

3.5.4 Vergleich der Anstiege des intrazellulären Kalziums nach Gabe von Quinin zwischen Zellen der Gallenblasen von TRPM5-KO-Mäusen zu Zellen der Gallenblasen von TRPM5-WT-Mäusen

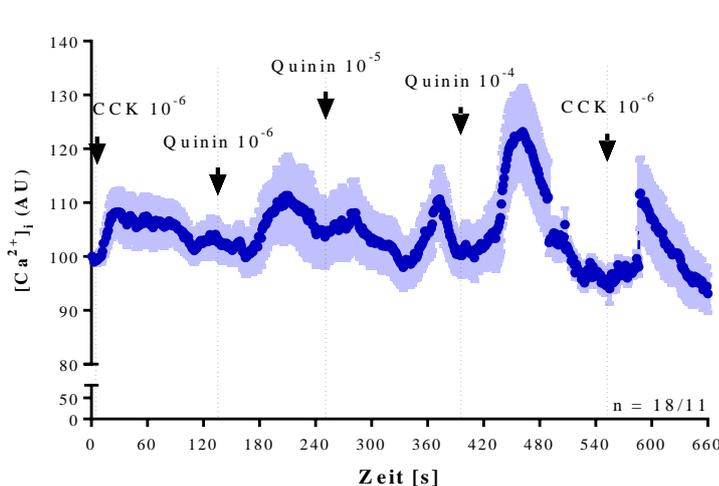


Abbildung 70 $[Ca^{2+}]_i$ der CCK^+ -Zellen der Gallenblase von TRPM5-WT-Mäusen nach Zugabe von DXM im Zeitverlauf. $N = 38$ Zellen von 3 Mäusen. Angabe der $[Ca^{2+}]_i$ in AU auf der Y-Achse. X-Achse beschreibt Zeit in Sekunden. Angabe der Konzentrationen in Molarität. Pfeile markieren die Stimulussetzung. Gezeigt werden Mittelwert und Standardfehler.

Um zu prüfen, ob die Ausschaltung des TRPM5-Kanals in den TRPM5-KO-Mäusen einen Effekt auf das Reaktionsausmaß der Zellen der Gallenblase nach Stimulation mit Quinin einen Unterschied bewirkt, wurden parallel Messungen an den entsprechenden Zellen von TRPM5-WT-Mäusen durchgeführt. Dabei zeigte sich in den insgesamt 18 CCK^+ -Zellen von 11 TRPM5-WT-Mäusen ein Anstieg des intrazellulären Kalziums nach Quinin-Gabe, der in einigen Zellen etwas verzögert kam, wodurch die teils doppelgipflig-scheinenden Anstiege in Abbildung 70 zustande kamen. Insgesamt konnte man eine gewisse Dosisabhängigkeit beobachten. Die Reaktionsausmaße schienen mit höherer Konzentration anzusteigen (Abbildung 70). Im Wilcoxon-matched-pairs-signed-rank-Test ergaben sich für alle Konzentrationen Quinin signifikante Anstiege des intrazellulären Kalziums (Abbildung 71). Im Vergleich der maximalen prozentualen Anstiege des intrazellulären Kalziums nach Gabe der verschiedenen Quinin-Konzentrationen zeigten sich in der statistischen Analyse im Friedman-Test keine signifikanten Unterschiede zwischen den Konzentrationen (Abbildung 72 A, Tabelle 32) und auch nicht im Vergleich zu CCK, wobei der p-Wert im Vergleich von CCK und Quinin 1×10^{-6} M mit 0,0615 grenzwertig war. Der einzige signifikante Unterschied bestand im Vergleich von der ersten Gabe CCK zu der zweiten, wobei das Reaktionsausmaß nach zweiter Gabe deutlich geringer ausfiel als das nach der ersten Gabe. Den geringsten Anstieg des intrazellulären Kalziums bewirkte unter den unterschiedlichen Quinin-Konzentrationen die Konzentration Quinin 1×10^{-6} M.

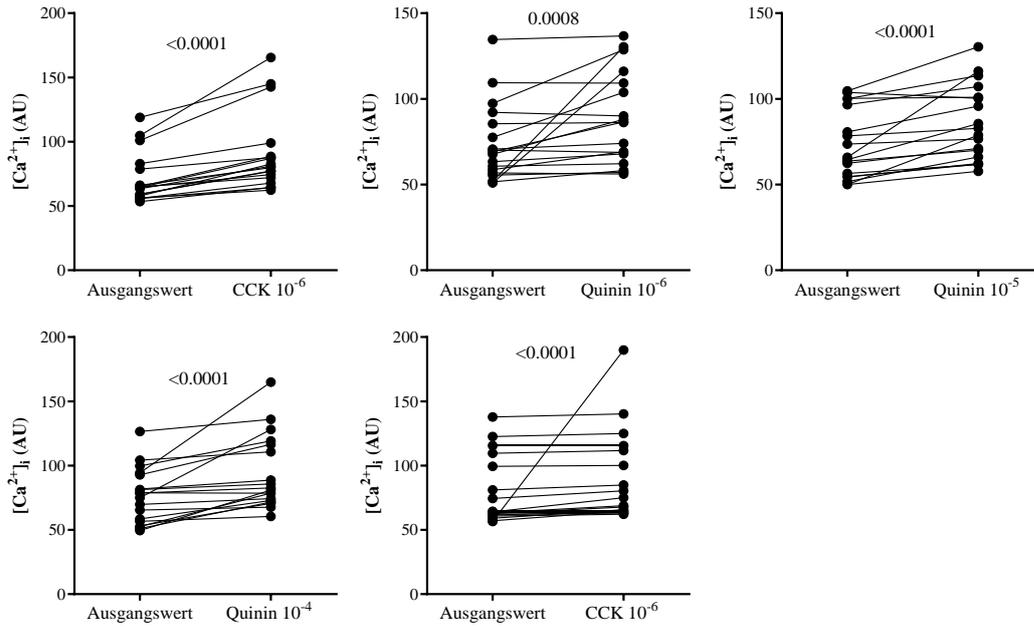


Abbildung 71 $[Ca^{2+}]_i$ vor und nach Stimulation mit CCK oder Quinin in glatten Muskelzellen der Gallenblase von TRPM5-WT-Mäusen. Messung mittels CLSM. Angabe der $[Ca^{2+}]_i$ in AU. Angabe der Konzentrationen in Molarität. Analyse mittels Wilcoxon-matched-pairs-signed-rank-Test mit Angabe des p -Wertes.

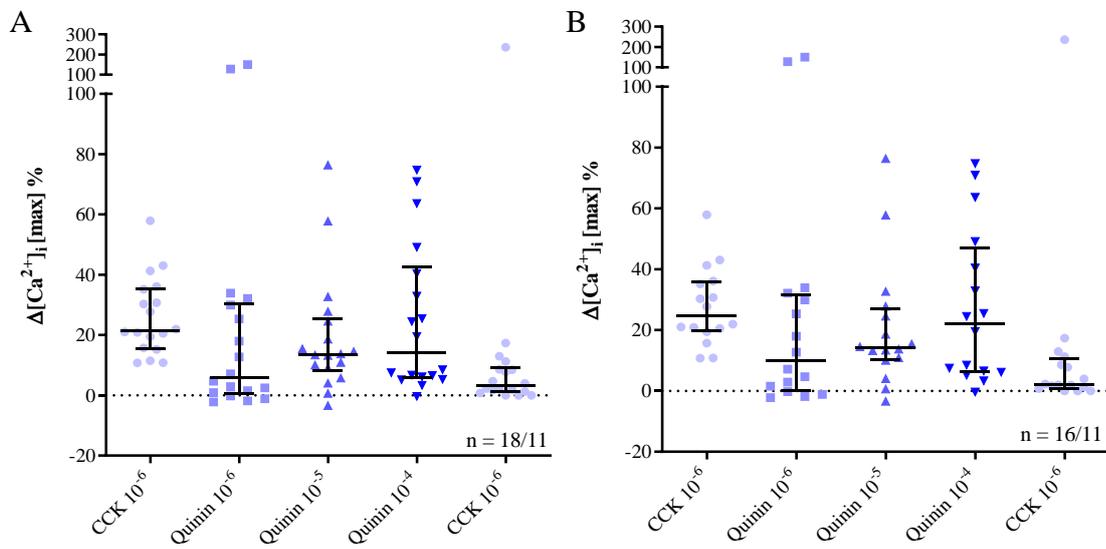


Abbildung 72 Maximale Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ der glatten Muskelzellen der Gallenblase von TRPM5-WT-Mäusen nach Stimulation mit Quinin. Maximale Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ nach Stimulusgabe im Verhältnis zum Ausgangswert. Darstellung des Medians mit Interquartilabstand. Angabe der Kalziumänderung in Prozent. Angabe der Konzentrationen in Molarität. (A) $N = 18$ Zellen von 11 Mäusen. (B) Darstellung der Responder. $N = 16$ Zellen von 11 Mäusen.

Tabelle 32 Analyse mit Friedman-Test. Vergleich der Kalziumreaktionen auf unterschiedliche Konzentrationen Quinin mit der Reaktion auf CCK und der Konzentrationen untereinander. Angabe der p-Werte. Analyse der Reaktionen der Responder untereinander mit Friedman-Test.

	CCK 10 ⁻⁶	Quinin 10 ⁻⁶	Quinin 10 ⁻⁵	Quinin 10 ⁻⁴
Quinin 10 ⁻⁶	0,0615			
Quinin 10 ⁻⁵	> 0,9999	> 0,9999		
Quinin 10 ⁻⁴	> 0,9999	> 0,9999	> 0,9999	
CCK 10 ⁻⁶	0,0157	> 0,9999	0,4526	0,7320
Responder				
Quinin 10 ⁻⁶	0,4422			
Quinin 10 ⁻⁵	> 0,9999	> 0,9999		
Quinin 10 ⁻⁴	> 0,9999	> 0,9999	> 0,9999	
CCK 10 ⁻⁶	0,0521	> 0,9999	0,7370	0,5740

Unter den CCK⁺-Zellen wurden 89 % als Responder identifiziert. Auch bei isolierter Betrachtung dieser Quinin-Responder (Abbildung 72 B) ergaben sich im Friedman-Test keine signifikanten Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Konzentrationen (Tabelle 32). Im Vergleich der maximalen prozentualen Anstiege des intrazellulären Kalziums der CCK⁺-Zellen zwischen den TRPM5-KO- und WT-Mäusen, zeigten sich im Mann-Whitney-Test keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 73 A). In der Tendenz sah man jedoch, dass der Unterschied mit steigender Quinin-Konzentration immer größer zu werden schien, wobei die glatten Muskelzellen der TRPM5-WT-Mäuse dabei etwas stärker reagierten. Für die Konzentration Quinin 1x10⁻⁶ M betrug der Unterschied zwischen den WT- und KO-Mäusen lediglich etwa 1 %. Nach Gabe der Konzentration Quinin 1x10⁻⁵ M betrug das Reaktionsausmaß der Zellen der TRPM5-KO-Mäuse etwa zwei Drittel von dem der Zellen der WT-Mäuse. Ein ähnliches Verhältnis war auch im Vergleich zwischen den Zellen der WT- und KO-Mäuse nach Gabe von Quinin 1x10⁻⁴ M zu beobachten (Abbildung 73 A). Bei isolierter Betrachtung der Responder ergaben sich in der statistischen Analyse im Vergleich zur Grundgesamtheit der CCK⁺-Zellen keine wesentlichen Unterschiede (Abbildung 73 B).

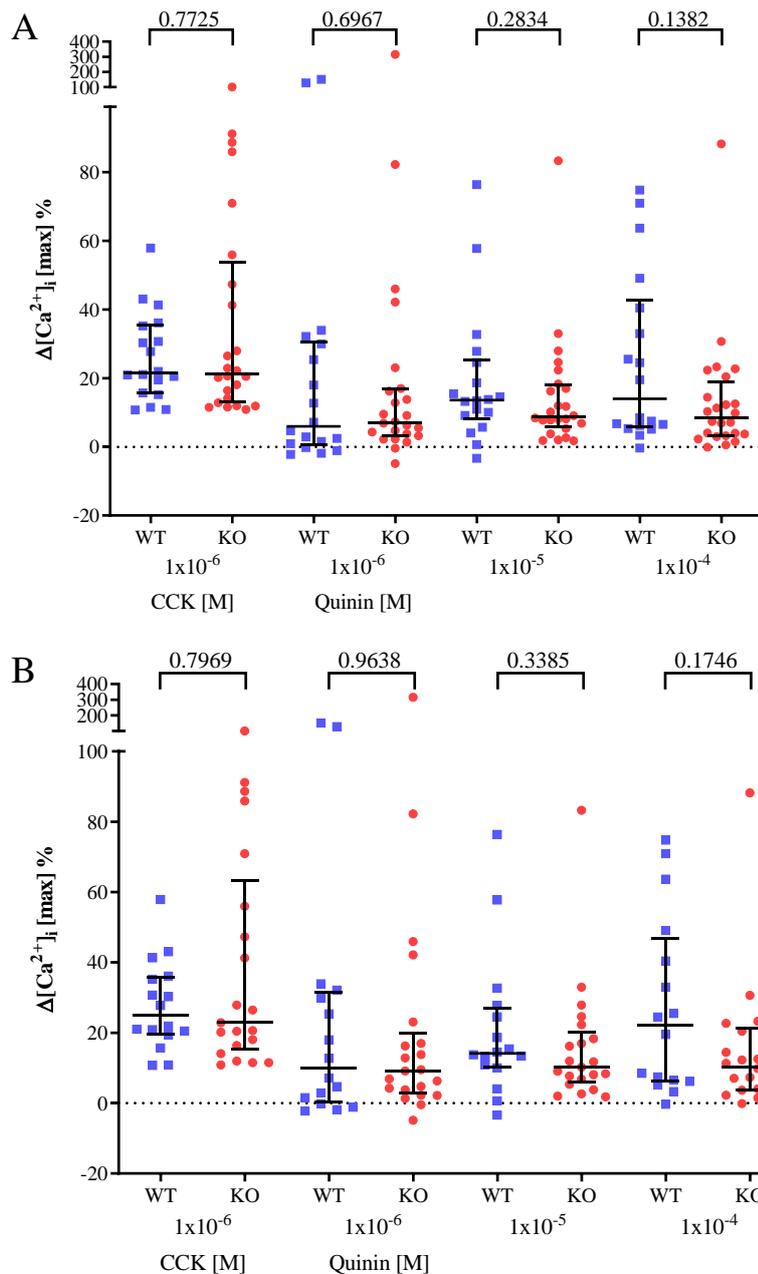


Abbildung 73 Vergleich der Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ von glatten Muskelzellen der Gallenblase von TRPM5-WT- (blaue Quadrate) und KO-Mäusen (rote Kreise) nach Stimulation mit Quinin. Messung mittels CLSM. Angabe der Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ in Prozent auf der Y-Achse. Angabe des Medians mit Interquartilabstand. Analyse mittels Mann-Whitney-Test unter Angabe der p-Werte. (A) TRPM5-WT $n = 18$ Zellen von 11 Mäusen. TRPM5-KO $n = 24$ Zellen von 12 Mäusen. (B) Darstellung der Responder. TRPM5-WT $n = 16$ Zellen von 11 Mäusen. TRPM5-KO $n = 21$ Zellen von 12 Mäusen.

Auch für diese Versuchsreihe wurden die Reaktionsausmaße auf Quinin im Verhältnis zu den Reaktionsausmaßen auf CCK berechnet (Abbildung 74 A). Es zeigte sich ein ähnliches Verhältnis zwischen den Zellen der TRPM5-WT- und KO-Mäuse, wobei die Zellen der TRPM5-WT-Mäuse im Median etwas stärker reagierten als die Zellen der KO-Mäuse. Auffällig war, dass sich für die Maximalkonzentration Quinin 1×10^{-4} M im Mann-Whitney-Test mit 0,0510 ein annähernd signifikanter p-Wert ergab. Auch hier ließ sich also beobachten, dass die Unterschiede in den Reaktionsausmaßen mit steigender Konzentration Quinin immer signifikanter wurden. Etwas weniger ausgeprägt zeigte sich dieser Effekt bei isolierter Betrachtung der Responder (Abbildung 74 B). Hier lag der p-

Wert im Mann-Whitney-Test für die Konzentration Quinin 1×10^{-4} M mit 0,1010 etwas höher.

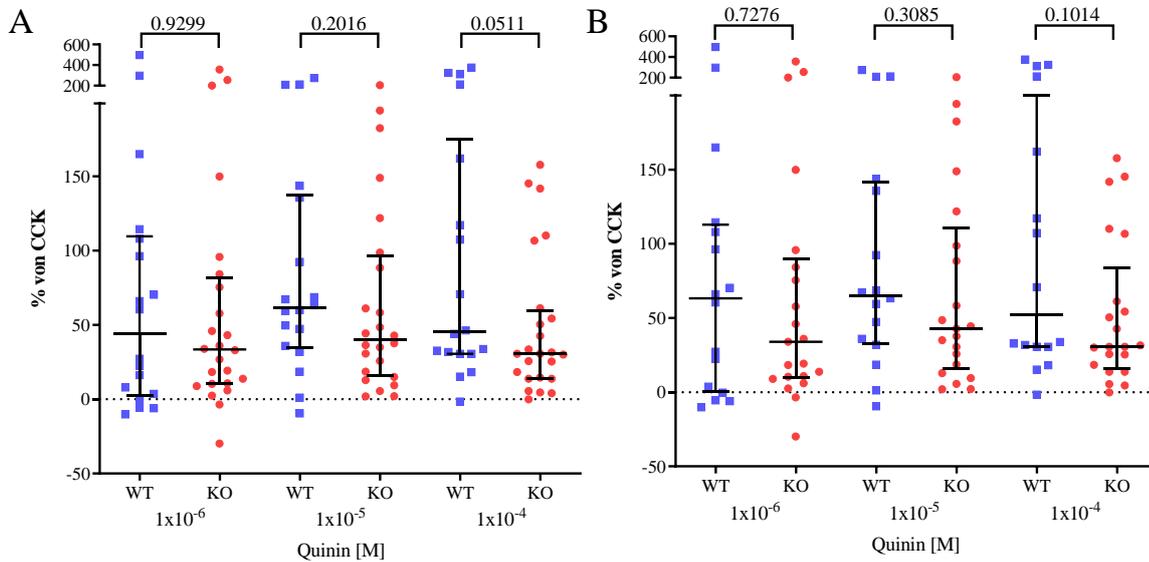


Abbildung 74 Vergleich der Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ der glatten Muskelzellen der Gallenblase von TRPM5-KO- und WT-Mäusen nach Stimulation mit Quinin im Verhältnis zur Antwort auf CCK. Darstellung des Medians mit Interquartilabstand. Maximale Reaktion auf Quinin in Prozent der maximalen Reaktion auf CCK. Analyse mit Mann-Whitney-Test mit Angabe der p-Werte. (A) TRPM5-WT $n = 18$ Zellen von 11 Mäusen. TRPM5-KO $n = 24$ Zellen von 12 Mäusen. (B) Darstellung der Responder. TRPM5-WT $n = 16$ Zellen von 11 Mäusen. TRPM5-KO $n = 21$ Zellen von 12 Mäusen.

Zusammenfassend kann man für den Vergleich der CCK⁺-Zellen der Gallenblasen von TRPM5-KO- und WT-Mäusen also sagen, dass zwar in beiden eine gewisse Reaktivität auf Quinin vorlag, die CCK⁺-Zellen der TRPM5-WT-Mäuse in der Tendenz besonders in den hohen Konzentrationen allerdings noch etwas stärker reagierten. Ein statistisch signifikanter Unterschied ließ sich jedoch für keine Quinin-Konzentration feststellen.

Auch bei den genetisch veränderten Mausstämmen wurde an CCK⁻-Zellen überprüft, ob es sich bei der Reaktion auf Quinin um einen muskelspezifischen Effekt handelte. Dafür wurden Messungen an insgesamt 56 CCK⁻-Zellen von 6 TRPM5-WT-Mäusen durchgeführt. Dabei zeigten sich Anstiege des intrazellulären Kalziums insbesondere nach Gabe der hohen Konzentrationen Quinin, wobei die Anstiege insgesamt nicht sehr ausgeprägt waren. Die Reaktion auf Quinin 1×10^{-5} M erfolgte dabei mit leichter Verzögerung (Abbildung 75). Die Streuung der Reaktionsausmaße war relativ breit.

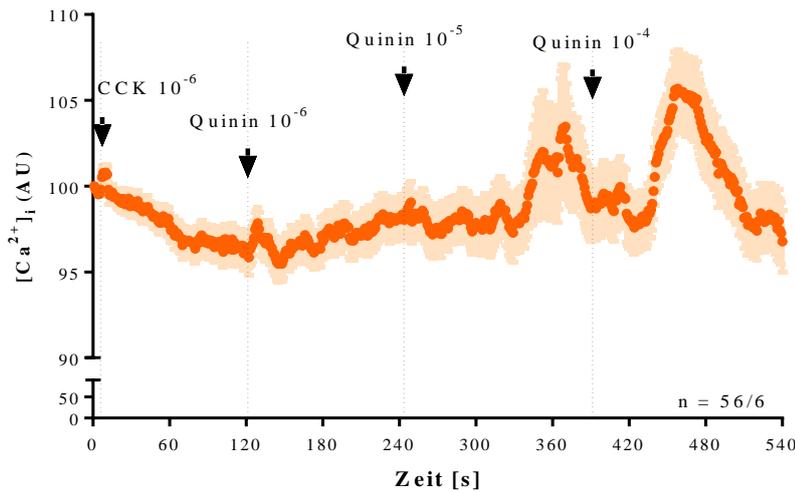


Abbildung 75 $[Ca^{2+}]_i$ nach Stimulation mit Quinin von CCK-Zellen der Gallenblase von TRPM5-WT-Mäusen im Zeitverlauf. $N = 56$ Zellen von 6 Mäusen. Angabe der $[Ca^{2+}]_i$ in AU auf der Y-Achse. X-Achse beschreibt Zeit in Sekunden. Angabe der Konzentrationen in Molarität. Pfeile markieren die Stimulussetzung. Gezeigt werden Mittelwert und Standardfehler.

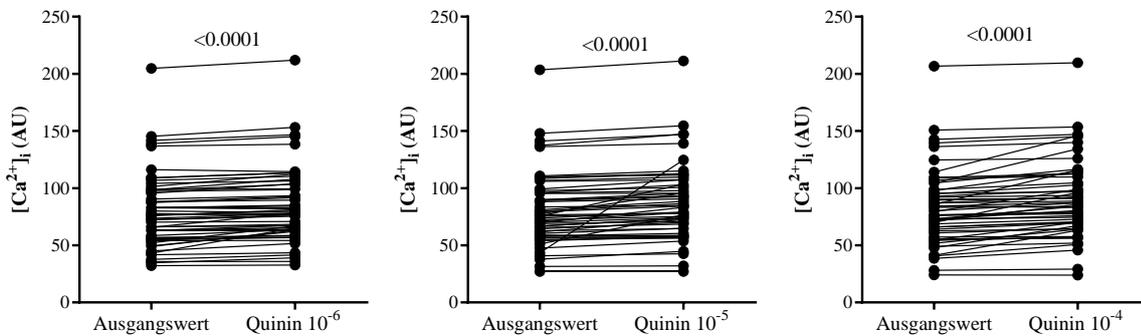


Abbildung 76 $[Ca^{2+}]_i$ vor und nach Stimulation mit Quinin in CCK-Zellen der Gallenblase von TRPM5-WT-Mäusen. Messung mittels CLSM. Angabe der $[Ca^{2+}]_i$ in AU. Angabe der Konzentrationen in Molarität. Analyse mittels Wilcoxon-matched-pairs-signed-rank-Test mit Angabe des p-Wertes.

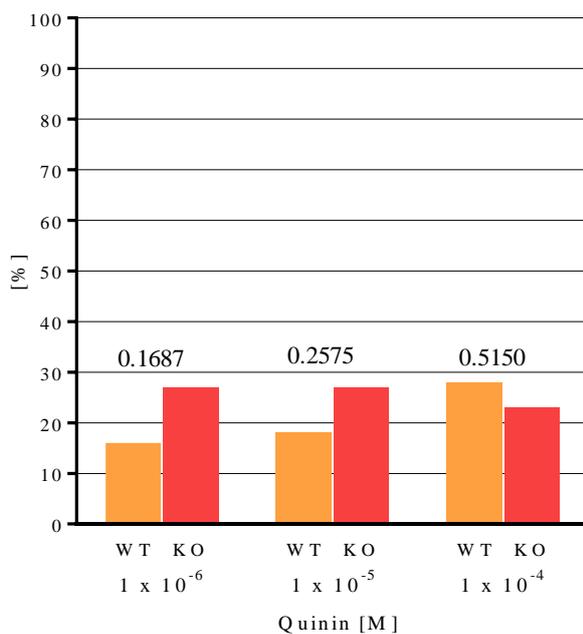


Abbildung 77 Prozentualer Anteil an CCK-Zellen von TRPM5-WT- (orange) und TRPM5-KO-Mäusen (rot), die auf die jeweilige Konzentration von Quinin mit einem mind. 10 %igen Anstieg reagiert haben (Responder). Analyse mittels Chi-square-Test unter Angabe der p-Werte. TRPM5-KO $n = 22$ Zellen. TRPM5-WT $n = 23$ Zellen.

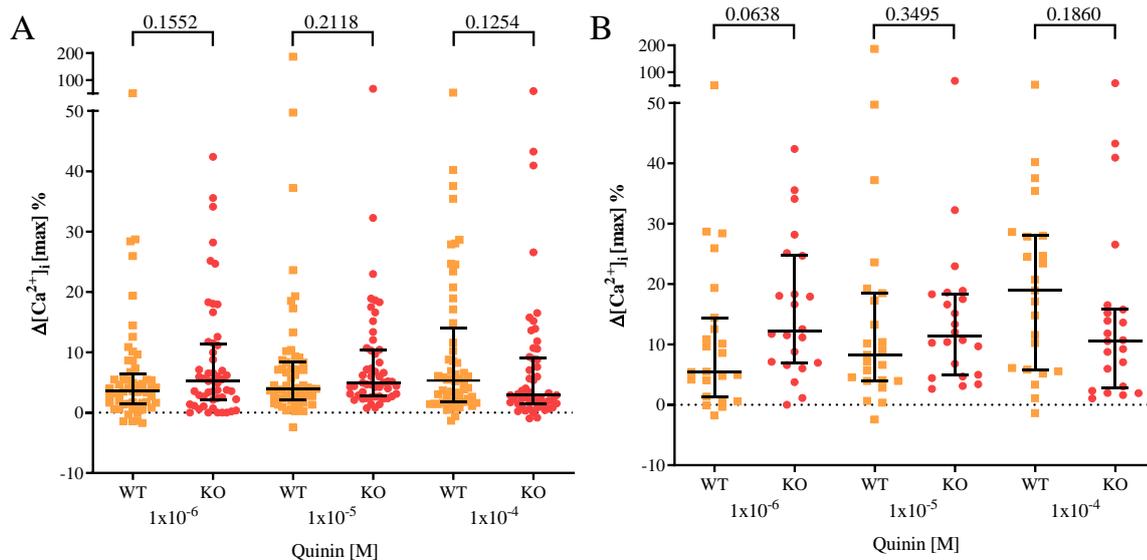


Abbildung 78 Vergleich der Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ von CCK⁻-Zellen der Gallenblase von TRPM5-WT- (orange Quadrate) und KO-Mäusen (rote Kreise) nach Stimulation mit Quinin. Angabe der Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ in Prozent auf der Y-Achse. Angabe des Medians mit Interquartilabstand. Analyse mittels Mann-Whitney-Test unter Angabe der p-Werte. (A) TRPM5-WT n = 56 Zellen von 6 Mäusen. TRPM5-KO n = 52 Zellen von 12 Mäusen. (B) Darstellung der Responder. TRPM5-WT n = 23 Zellen. TRPM5-KO n = 22 Zellen.

Viele Zellen zeigten keine Reaktion, während es in anderen Zellen wiederum zu sehr hohen Anstiegen des intrazellulären Kalziums kam. Dabei ergab der Wilcoxon-matched-pairs-signed-rank-Test für alle Konzentrationen Quinin signifikante Anstiege (Abbildung 76). Unter den CCK⁻-Zellen der TRPM5-WT-Mäuse wurden 41 % als Responder identifiziert (Abbildung 77). Im Vergleich zu den CCK⁻-Zellen der TRPM5-KO-Mäuse gab es hier relativ gesehen keine signifikanten Unterschiede im Chi-square-Test.

Im Vergleich der prozentualen Reaktionsausmaße der CCK⁻-Zellen der TRPM5-KO- und WT-Mäuse fiel ebenfalls auf, dass es für keine Quinin-Konzentration einen signifikanten Unterschied im Mann-Whitney-Test gab (Abbildung 78 A). Anders als es zum Beispiel bei den CCK⁺-Zellen der Fall war, zeigte sich auch keine dosisabhängige Tendenz, dass die Zellen des einen Mausstammes stärker reagieren würden als die des anderen (Abbildung 78 A). Bei isolierter Betrachtung der Responder zeigte sich lediglich ein annähernd signifikanter Unterschied zwischen den Mausstämmen auf die Konzentration Quinin 1×10^{-6} M mit einem p-Wert von 0,0635 im Mann-Whitney-Test (Abbildung 78 B). Die Reaktionsausmaße auf alle Konzentrationen Quinin lagen bei beiden Mausstämmen unter 10 % im Median, zumindest bei Betrachtung der Grundgesamtheit.

Zusammenfassend kann man also sagen, dass die Anstiege des intrazellulären Kalziums in den CCK-Zellen nach Quinin-Gabe sowohl der TRPM5-WT- als auch der TRPM5-KO-Mäuse mit ein paar Ausnahmen sehr gering ausfielen. Je nach Konzentration Quinin zeigte sich für den einen oder anderen Mausstamm eine Tendenz zum höheren Reaktionsausmaß, wobei es insgesamt keinen statistischen Unterschied gab.

3.6 Ergebnisse der Immunhistochemie

Nachdem in den Messungen des intrazellulären Kalziums der glatten Muskelzellen nach Stimulation mit Bittersubstanzen Reaktionen beobachtet wurden, wurden zusätzlich immunhistochemische Färbungen durchgeführt, um die Existenz von Elementen der Geschmackskaskade in der glatten Muskulatur der Gallenblase zu überprüfen. Die glatte Muskulatur der Gallenblase wurde immunhistochemisch in Paraffinschnitten mithilfe eines monoklonalen Antikörpers gegen Smooth Muscle Actin (SMA) markiert. Es zeigte sich eine kräftige Muskelschicht (Abbildung 79). In der benachbarten Epithelschicht fanden sich vereinzelt *Trpm5*-positive Zellen (Abbildung 79), von denen einige auch zusätzlich GNAT-positiv waren (Abbildung 79).

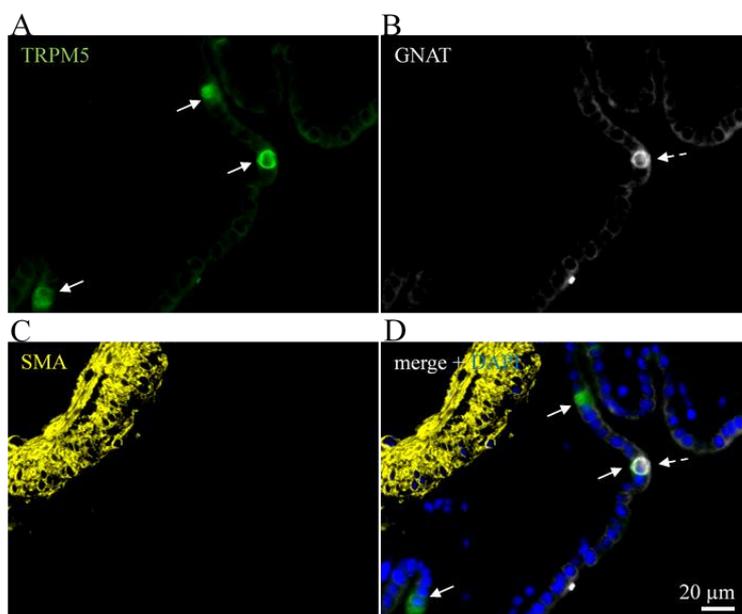


Abbildung 79 Cholinerge Bürstenzellen und glatte Muskulatur der Gallenblase einer Maus. Dreifach-Immunfluoreszenz und Kernmarkierung mit DAPI. Paraffinschnittpräparat. (A) *Trpm5*-positive, rundliche Zellen zeigen sich in der Epithelschicht der Gallenblase (Pfeile). (B) Eine dieser Zellen ist ebenfalls GNAT-positiv (gestrichelter Pfeil). (C) Glatte Muskulatur der Gallenblase markiert mit Smooth Muscle Actin Antikörper. (D) Kein *Trpm5*- oder GNAT-Nachweis in der glatten Muskulatur. Nicht alle *Trpm5*-positiven Zellen sind auch GNAT-positiv.

Es konnten in den Schnitten weder *Trpm5*-, noch GNAT-positiv Zellen, wobei deren Vorhandensein in einzelnen Epithelzellen der Gallenblase als Positivkontrolle diente, in der glatten Muskulatur nachgewiesen werden. Neben *Trpm5* und GNAT wurde die glatte Muskulatur der Gallenblase mithilfe spezifischer Antikörper auch auf das Vorhandensein von PLC β 2 getestet, einem weiteren Element der Geschmackskaskade.

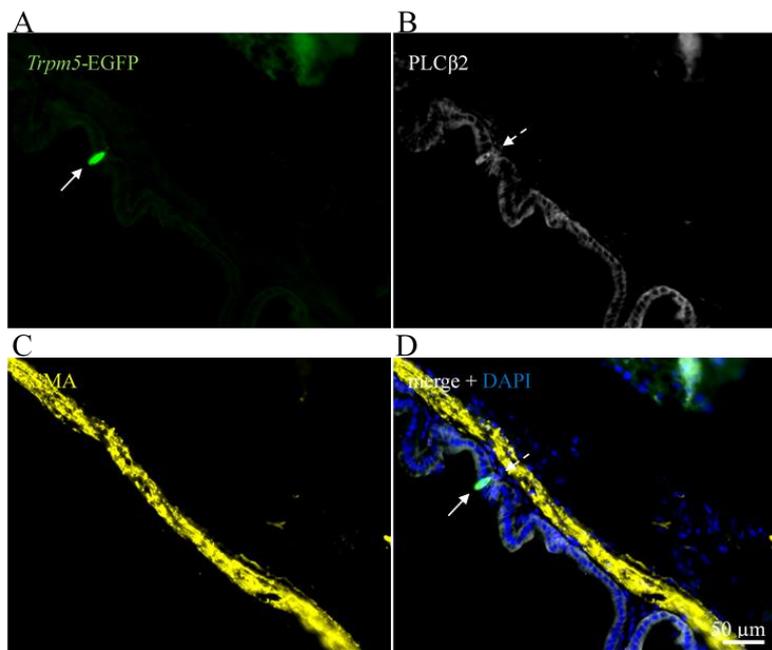


Abbildung 80 Gallenblase einer *Trpm5-EGFP*-Maus mit Darstellung der Epithelschicht und glatten Muskulatur. Dreifach-Immunfluoreszenz, Paraffinschnittpräparat. (A) Immunfluoreszenzmarkierung mit einem Antikörper gegen eGFP von einer einzelnen, länglichen *Trpm5-EGFP* positiven Zelle (Pfeil) in der Epithelschicht der Gallenblase. (B) Die gleiche Zelle ist auch *PLCβ2*-positiv (gestrichelter Pfeil), wenn auch nur sehr schwach. (D) *Trpm5-EGFP* und *PLCβ2* finden sich kolokalisiert beide in der Epithelschicht, nicht jedoch (C) in der glatten Muskulatur.

Dabei fanden sich in geringer Dichte schwach *PLCβ2*-positive Zellen in der Epithelschicht der Gallenblase einer *Trpm5-EGFP*-Maus (Abbildung 80). Bei diesem Reportermausstamm wird unter der Kontrolle des *Trpm5*-Promotors ein grün-fluoreszierendes Protein (EGFP) exprimiert, welches sich ebenfalls immunhistochemisch mit spezifischen Antikörpern darstellen ließ. Hier zeigte sich eine Expression von EGFP in *PLCβ2*-positiven Zellen (Abbildung 80). Keine der beiden Elemente konnten in der glatten Muskulatur, welche mit einem Antikörper gegen SMA angefärbt wurde, nachgewiesen werden.

Zuletzt wurden auch immunhistochemische Färbungen durchgeführt, die das Vorhandensein des Bürstenzellmarkers ChAT überprüfen sollten (Abbildung 81). Dafür wurden erneut *Trpm5-EGFP*-Mäuse verwendet, bei denen EGFP mit einem spezifischen Antikörper markiert wurde. Zusätzlich wurde die ChAT mit einem spezifischen Antikörper markiert. Dabei fiel auf, dass EGFP - und damit *Trpm5*- und ChAT eine Kolokalisation zeigten. In der glatten Muskulatur, welche wieder mit SMA markiert wurde, zeigte sich weder eine Kolokalisierung mit EGFP, noch mit ChAT. Wie es trotz fehlender Elemente der Geschmackskaskade in der glatten Muskulatur zu einer Reaktion auf Bittersubstanzen kommen konnte, wird im Folgenden diskutiert.

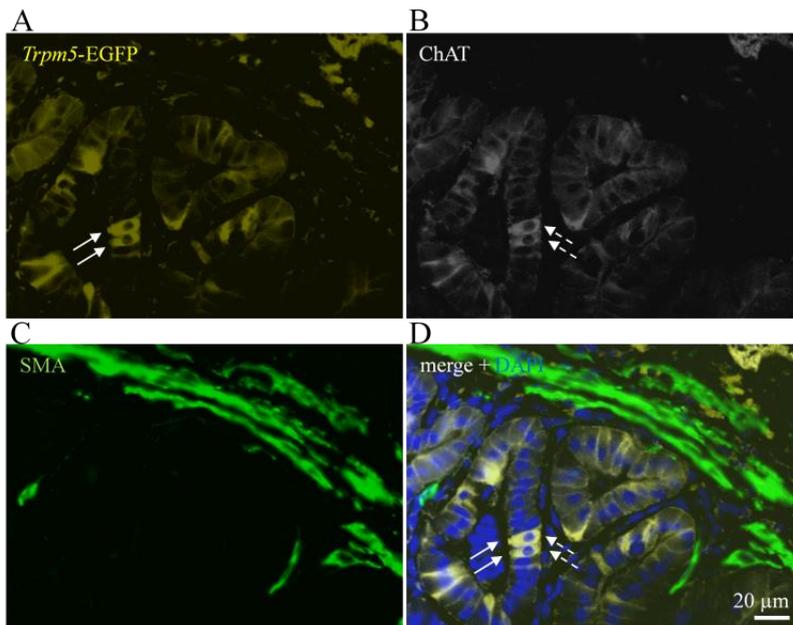


Abbildung 81 ChAT-exprimierende Zellen in epithelialer Schicht der Gallenblase einer *Trpm5-EGFP*-Maus. Dreifach-Immunfluoreszenz und Kernmarkierung mit DAPI, Paraffinschnittpräparat. (A) *Trpm5-EGFP*-Immunreaktivität in einzelnen Zellen der Epithelschicht der Gallenblase (Pfeil). Die Zellen sind länglich, der Zellkern befindet sich am basalen Zellpol und am apikalen Zellpol lässt sich bei genauer Betrachtung ein schmaler Bürstensaum erkennen. (B) ChAT-Immunreaktivität in einzelnen Zellen der Epithelschicht der Gallenblase (gestrichelte Pfeile). (C) SMA-Immunreaktivität der muskulären Schicht der Gallenblase. (D) Das Überlagerungsbild zeigt eine Kolokalisierung von *Trpm5-EGFP* und ChAT im Gallenblasenepithel, nicht aber mit SMA. DAPI zeigt zusätzlich die Lokalisation der Zellkerne.

4. Diskussion

Glatte Muskelzellen bestimmter Organe wie beispielweise des arteriellen Gefäßsystems oder der Atemwege reagieren nach Stimulation mit verschiedenen Bittersubstanzen mit einer Erhöhung des intrazellulären Kalziums [27, 74, 100]. Dabei scheint sich glatte Muskulatur konzentrationsabhängig nach Stimulation mit Bittersubstanzen entweder zu relaxieren oder zu kontrahieren [27, 55]. Bislang ist allerdings ungeklärt, ob diese Effekte durch Bürstenzellen vermittelt werden, oder ob Bittersubstanzen möglicherweise auch direkte Effekte auf die glatte Muskulatur der Gallenblase ausüben. Gegenstand dieser Arbeit ist die Frage, ob glatte Muskelzellen der Gallenblase nach Stimulation mit Bittersubstanzen in Form einer Veränderung der Konzentration des intrazellulären Kalziums reagieren. Die glatten Muskelzellen der Gallenblase wurden mittels CCK identifiziert, welches als Peptidhormon gezielt die glatten Muskelzellen stimuliert [137].

4.1 Effekte von Bittersubstanzen auf die glatte Muskulatur der Gallenblase von Mäusen

4.1.1 Reaktionen glatter Muskelzellen auf Denatonium

Die glatten Muskelzellen der Gallenblase reagierten in unterschiedlichem Ausmaß auf die getesteten Bittersubstanzen mit einem Anstieg des intrazellulären Kalziums. Insbesondere bei DXM und Quinin schien es dabei auch eine gewisse Konzentrationsabhängigkeit zu geben, während die Effekte auf Den eher gering ausgeprägt und unspezifisch waren. Glatte Muskelzellen der Gefäßwände von Rindern und Ratten reagieren nach Stimulation mit Den in der Konzentration 10 mM mit einem Anstieg des intrazellulären Kalziums [71]. Weiterhin besitzen sie Genprodukte für Bitterrezeptoren der Familie TAS2R [71]. Auch glatte Muskelzellen menschlicher Atemwege reagieren nach Stimulation mit Den mit einem Anstieg des intrazellulären Kalziums [27]. Paradoxe Weise geht hier die Erhöhung des intrazellulären Kalziums mit einer Membranhyperpolarisation und einer Relaxation einher [27]. Genprodukte für Bitterrezeptoren der Familie TAS2R konnten auch hier nachgewiesen werden. Auch weitere TAS2R-Agonisten, wie Saccharin oder Chloroquin, führen zu einer Relaxation der glatten Muskulatur über unter anderem PLC β - und IP₃-abhängige Signalwege [27]. In einzelnen Zellen des Gallenblasenepithels ließ sich mRNA der Bitterrezeptorenfamilie TAS2R mit den Mitgliedern 108, 126, 135, 137, 138, und 143 finden [110]. In der glatten Muskulatur der Gallenblase wurden diese allerdings bisher nicht beschrieben. In der vorliegenden Arbeit führte die Zugabe von Den in den CCK⁺-Zellen zu geringen Anstiegen des intrazellulären Kalziums ohne klare Konzentrationsabhängigkeit. Die fehlende Konzentrationsabhängigkeit ist in diesem Fall ein Hinweis gegen spezifische, rezeptorvermittelte Effekte. Übereinstimmend damit konnten Lu et al. zeigen, dass eine Ausschaltung des Genclusters für die Bitterrezeptoren Tas2r143/Tas2r135/Tas2r126 zu keiner Veränderung der Relaxationsintensität der bronchialen glatten Muskulatur nach Bitterstimulation bewirkt, sodass die Hypothese, die Relaxation würde darüber vermittelt werden, in Frage gestellt werden musste [66].

Es wurden auch schädliche Effekte von Den beschrieben. In Epithelzellen der Atemwege führte eine Behandlung mit Den bereits in geringen Konzentrationen von 1 bis 2 mM zu einer Schädigung der Mitochondrien und führte in vielen Zellen zur Apoptose [143]. Da Mitochondrien unter anderem ein Speicherort für Kalzium sind, ist hier ein durch Mitochondrienschädigung induzierter Anstieg des intrazellulären Kalziums nach Stimulation

mit Den nicht auszuschließen. Auch in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass nach Gabe der Maximaldosis Den die Reaktion der glatten Muskelzellen auf CCK deutlich geringer ausfiel als vor der Gabe von Den, was einen Hinweis auf mögliche toxische Effekte darstellt. Weiterhin wurden in glatten Muskelzellen des Gastrointestinaltraktes Mechanorezeptoren beschrieben [48]. Die Zellen nutzen Mechanorezeptoren, um auf sie einwirkende Kräfte in elektrische und biochemische Signale umzuwandeln [48]. So sind natürlich mechanisch-vermittelte Effekte auf die glatten Muskelzellen, die allein durch das Hinzugeben der Testsubstanz hervorgerufen werden, trotz größter Sorgfalt nicht zu eliminieren. In den Vehikelkontrollen wurden Anstiege des intrazellulären Kalziums bis zu 9 % beobachtet. Dies ist zum einen durch mögliche toxische Effekte des Vehikels selbst, zum anderen jedoch auch über eine Aktivierung der Mechanorezeptoren zu erklären. Im statistischen Vergleich zwischen den Reaktionen auf die verschiedenen Konzentrationen Den und der Vehikelkontrolle ergab sich kein signifikanter Unterschied, sodass man abschließend sagen kann, dass Den keine spezifischen Effekte und keine bitterrezeptorvermittelten Effekte auf glatte Muskelzellen der Gallenblase ausübt und die geringen beobachteten Effekte unspezifischer Natur sind, möglicherweise toxisch oder mechanosensibel vermittelt.

4.1.2 Vergleich der Reaktionen CCK⁻-Zellen mit CCK⁺-Zellen auf Denatonium

Um zu überprüfen, ob es sich bei den Den-vermittelten Effekten um zellspezifische Effekte handelte, oder ob möglicherweise andere Zellen als glatte Muskelzellen spezifische Effekte aufweisen, wurden ebenfalls Messungen an CCK⁻-Zellen durchgeführt. Auch hier ließen sich in einem geringen Anteil der Zellen gewisse Effekte nachweisen. Den wurde durch Lasconi et al. (2019) an Epithelzellen der Trachea von Ratten getestet. Sie fanden heraus, dass 39 % der Zellen, die auf ATP reagieren, dosisabhängig mit einem Anstieg des intrazellulären Kalziums auch auf Den reagieren [62]. Diese Dosisabhängigkeit konnte in den Experimenten an CCK⁻-Zellen der Gallenblase nicht bestätigt werden. Insgesamt reagierten auch weniger als 20 % dieser Zellen auf Den. Dennoch fiel auf, dass die glatten Muskelzellen im direkten Vergleich in der Tendenz insbesondere auf die niedrigen Konzentrationen etwas stärker reagierten, jedoch ohne signifikante Unterschiede. Wenn zellspezifische Effekte auf glatte Muskelzellen der Gallenblase vorliegen sollten, sind diese, wenn überhaupt, nur in den niedrigeren Konzentrationen vorhanden. Die Reaktionen in den höheren Konzentrationen sind eher auf andere Einflüsse zurück-

zuföhren, wie beispielsweise eine Reaktion auf das Vehikel. Insgesamt ist allerdings zu beachten, dass die Reaktionen der Zellen in keiner Konzentration besonders ausgeprägt waren.

Schütz et al. fanden heraus, dass es nach Stimulation der Bürstenzellen im Colon der Maus mit bestimmten Bittersubstanzen, insbesondere Den, zu Erhöhungen des intrazellulären Kalziums kommt. Auch in den Nicht-Bürstenzellen des Colonepithels wurden Anstiege des intrazellulären Kalziums nach Stimulation mit Den beobachtet, jedoch mit zeitlicher Verzögerung. Das wiederum wurde mit einer büstenzellvermittelten Freisetzung von ACh erklärt, welches andere Zellen in der Umgebung stimulieren könnte [119]. Ein solcher parakriner Effekt konnte bereits im Trachealepithel und in der Urethra gezeigt werden [25, 58, 95]. Schütz et al. führte die Kalziummessungen lediglich mit der Konzentration Den 1×10^{-3} M durch [119]. Die in dieser Arbeit beschriebene zeitliche Verzögerung der Reaktion der Nicht-Bürstenzellen konnte im Rahmen dieser Arbeit im Falle von Den nur für die Konzentration 1×10^{-4} M beobachtet werden. Für alle anderen Konzentrationen erfolgt der Kalziumanstieg unmittelbar nach Zugabe von Den, was gegen einen sekundär über ACh vermittelten Anstieg sprechen würde. Es gilt allerdings zu beachten, dass Schütz et al. die Messungen an Colonepithelzellen und nicht an der Gallenblase durchführten. Weiterhin wurden in früheren Messreihen an glatten Muskelzellen von verschiedenen Autoren immer wieder spontane Anstiege der Konzentration des intrazellulären Kalziums beobachtet [37]. Insbesondere für Anstiege des intrazellulären Kalziums mit zeitlicher Verzögerung wäre auch eine spontane Aktivität der glatten Muskelzelle ohne direkten Zusammenhang mit der Bittersubstanz denkbar.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass weder in CCK⁺- noch in CCK⁻-Zellen der Gallenblase von Mäusen spezifische oder konzentrationsabhängige Effekte auf Den nachgewiesen werden konnten. Es ergaben sich in dieser Arbeit keinerlei Hinweise auf rezeptorvermittelte Effekte auf Den, auch wenn andere Arbeiten fraglich rezeptorvermittelte Effekte in anderen Organen beschrieben haben.

4.1.3 Reaktionen glatter Muskelzellen auf DXM und Quinin

Anders als bei Den, reagierten die glatten Muskelzellen der Gallenblase insbesondere auf die niedrigen und mittleren Konzentrationen DXM und Quinin mit einem auch im Vergleich zur Vehikelkontrolle signifikanten Anstieg des intrazellulären Kalziums. Es zeigte sich sogar eine gewisse Konzentrationsabhängigkeit. Es bleibt zu klären, ob es sich bei

diesen Effekten zum einen um zellspezifische und zum anderen um rezeptorvermittelte Effekte handelt. Grundsätzlich lässt sich sagen, dass eine dosisabhängige Reaktion der Zelle auch für eine rezeptorvermittelte Reaktion spricht [146]. Ein abnehmendes Reaktionsausmaß mit steigender Konzentration wäre beispielsweise durch eine Rezeptorinternalisierung und Desensitivierung zu erklären [64]. Weiterhin gilt zu beachten, dass in vielen Arbeiten zum Nachweis von Bitterrezeptoren lediglich ein RT-PCR-Nachweis der mRNA durchgeführt wurde, eine Genexpression jedoch nicht automatisch auch mit einer funktionellen Expression von Bitterrezeptoren korreliert [57]. Rezeptoren der Familie TAS2R, oder deren mRNA, konnten bereits in zahlreichen extraoralen Geweben, insbesondere in Bürstenzellen, nachgewiesen werden. Bitterrezeptoren finden sich in glatter Muskulatur des Magens von Mäusen und von Menschen. Auch Teile der Geschmacks-transduktionskaskade sind hier nachgewiesen worden [6]. Auch in weiteren Teilen des Gastrointestinaltraktes wurden Bitterrezeptoren nachgewiesen [98]. Nadjombati et al. untersuchten speziell Bürstenzellen des Gastrointestinaltraktes auf das Vorhandensein von Bitterrezeptoren und fanden interessanterweise keine Bitterrezeptoren in Bürstenzellen der Gallenblase [85], wenngleich auch im Rahmen dieser Arbeit einige wenige nachgewiesen werden konnten (Tas2R 108, 126, 135, 137, 143). In glatten Muskelzellen menschlicher Atemwege konnte die Expression von Bitterrezeptoren der Familie TAS2R mittels RT-PCR-Test nachgewiesen werden [132]. Upadhyaya et al. testeten unter anderem DXM und Quinin sowohl an bronchialer glatter Muskulatur als auch an glatter Muskulatur von Pulmonalarterien von Schweinen. DXM führte dabei zu dem größten Anstieg des intrazellulären Kalziums, dicht gefolgt von Quinin. Auch hier zeigt sich eine Konzentrationsabhängigkeit. Eine Reduktion des Rezeptors T2R1 durch Transfektion der glatten Muskelzellen mit shRNA führt weiterhin zu einer verminderten Reaktion der Muskelzellen auf DXM [132]. Die Messungen wurden allerdings nur an Zellen durchgeführt, die den Rezeptor T2R1 besaßen. Ob DXM auch in anderen Zellen zu einem Anstieg des intrazellulären Kalziums führt, bleibt in dieser Arbeit offen. Dennoch wird die These unterstützt, dass DXM rezeptorvermittelte Effekte auf glatte Muskulatur ausübt. Im Gegensatz zu Den wurden für DXM sogar auf bestimmte Zellen protektive Einflüsse beschrieben, was einen toxisch bedingten Anstieg des intrazellulären Kalziums unwahrscheinlich macht [65]. Gegen toxisch vermittelte Effekte spricht weiterhin, dass die glatten Muskelzellen auch nach der Gabe der Maximalkonzentration DXM noch auf CCK reagieren, wenn auch etwas geringer als vor der DXM-Gabe. Für einen rezeptorvermittelten Effekt von DXM auf die glatte Muskulatur der Gallenblase spricht also eine ge-

wisse Konzentrationsabhängigkeit der Kalziumreaktionen sowie der Nachweis von Bitterrezeptoren in glatter Muskulatur der Atemwege und Gefäße sowie der Nachweis von Bitterrezeptoren in großen Teilen des Gastrointestinaltraktes. Dagegen spräche unter anderem der fehlende Nachweis von Bitterrezeptoren in Bürstenzellen der Gallenblase. Für einen endgültigen Beweis sind weitere Untersuchungen notwendig. Denkbar wäre auch eine rezeptorvermittelte Reaktion, die jedoch nicht über Bitterrezeptoren vermittelt wird. Die Frage, ob nicht nur rezeptorvermittelte, sondern auch zellspezifische Effekte vorliegen, wird im folgenden Kapitel genauer betrachtet.

Die Reaktionen der glatten Muskelzellen auf Quinin unterschieden sich in einigen Punkten zu denen auf Den und DXM. Auffällig war vor allem, dass das größte Reaktionsausmaß auf die geringste Konzentrationen Quinin 1×10^{-6} M zu beobachten war. Hier entsprach das Reaktionsausmaß im Median fast dem von CCK, während es in den höheren Konzentrationen Quinin 1×10^{-5} M und 1×10^{-4} M nicht mal der Hälfte entsprach. Auf eine mögliche Desensitivierung wird im Folgenden noch weiter eingegangen. Ein signifikanter Unterschied der Reaktionsausmaße zu der Vehikelkontrolle zeigte sich ebenfalls nur bei der niedrigsten Konzentration Quinin 1×10^{-6} M. Weiterhin fiel auf, dass es nach Gabe der Konzentration Quinin 1×10^{-5} M einen zweigipfligen Verlauf der Kurve gab. Der erste Anstieg des intrazellulären Kalziums ereignete sich unmittelbar nach Gabe von Quinin. Nach kurzer zeitlicher Verzögerung gab es einen erneuten kurzen Anstieg. Denkbar für dieses Phänomen wäre ein erster Kalziumanstieg als eine direkte Reaktion auf Quinin und ein zweiter Kalziumanstieg vermittelt über sekundäre ACh-Ausschüttung von Gallenblasenepithelzellen, wie es bereits von anderen Autoren an anderen Organen in ähnlicher Weise beobachtet und vermutet wurde [119]. Auch in diesem Fall wäre, wie es bereits für Den diskutiert wurde, eine spontane Aktivität der glatten Muskelzelle nicht auszuschließen [37]. Die Ergebnisse dieser Messungen geben also Hinweise auf eine mögliche spezifische Reaktion der glatten Muskelzellen auf Quinin in niedriger Konzentration.

4.1.4 Vergleich der Reaktionen CCK⁻-Zellen mit CCK⁺-Zellen auf DXM und Quinin

Um zu klären, ob es sich bei den Reaktionen der glatten Muskelzellen auf DXM und Quinin nicht nur um rezeptorvermittelte, sondern auch um zellspezifische Effekte handelt, wurden Messungen ebenfalls an CCK⁻-Zellen durchgeführt. Zunächst einmal lässt sich dazu sagen, dass Anstiege des intrazellulären Kalziums in den CCK⁻-Zellen sowohl

auf Quinin als auch auf DXM beobachtet wurden. Es ist davon auszugehen, dass sich unter den CCK⁻-Zellen auch Bürstenzellen befinden, da diese in hoher Dichte in der Gallenblase vorkommen [68].

Wie bei den glatten Muskelzellen ist auch bei der Reaktion der CCK⁻-Zellen auf DXM eine gewisse Konzentrationsabhängigkeit zu beobachten. Die Kalziumanstiege waren für jede Konzentration DXM signifikant, wobei das intrazelluläre Kalzium, wie auch bei den glatten Muskelzellen, nach Gabe der mittleren Konzentrationen DXM 1×10^{-5} M und 1×10^{-4} M am meisten anstieg. Betrachtet man nun zunächst die Anzahl der Responder auf DXM unter den CCK⁺-Zellen und CCK⁻-Zellen, fällt auf, dass es auf die niedrigeren Konzentrationen DXM signifikant weniger Responder unter den CCK⁻-Zellen gab. Auf die höheren DXM-Konzentrationen gab es hingegen keinen signifikanten Unterschied in der Anzahl der Responder. Dieses Bild spiegelte sich auch in den Reaktionsausmaßen der unterschiedlichen Zellen wider. Während die CCK⁺-Zellen auf DXM signifikant stärker reagierten, waren im Bereich der höheren DXM-Konzentrationen die Reaktionsausmaße der CCK⁻-Zellen in der Tendenz etwas stärker, wenngleich auch hier kein signifikanter Unterschied vorlag. Zellspezifische Effekte liegen also möglicherweise für geringe Konzentrationen DXM vor, nicht aber für höhere. Effekte von Bittersubstanzen auf Bürstenzellen wurden bereits für andere Organe beschrieben [25, 59]. Wie bereits erwähnt, ist laut Nadjisombati et al. an Bürstenzellen der Gallenblase keine Expression von Bitterrezeptoren nachzuweisen [85], wenn auch die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass einige wenige möglicherweise doch exprimiert werden. Dennoch reagierten fast alle Zellen auf eine hohe Konzentration DXM mit einem Kalziumanstieg. Eine mögliche Ursache hierfür wäre eine unspezifische Aktivierung verschiedener Rezeptoren durch DXM in hoher Konzentration.

Betrachtet man die Reaktionen der CCK⁻-Zellen auf Quinin, fällt auf, dass im Gegensatz zu den CCK⁺-Zellen die Reaktionsausmaße mit steigender Quinin-Konzentration zunehmen. Im Vergleich der Anzahl der Responder spiegelte sich dieser Trend ebenfalls wider. Insbesondere auf Quinin 1×10^{-6} M reagierten die CCK⁻-Zellen signifikant weniger. Mit steigender Quinin-Konzentration überschritt jedoch die Anzahl der Responder der CCK⁻-Zellen die der CCK⁺-Zellen. Die Reaktionsausmaße der Responder der beiden Gruppen waren für alle Quinin-Konzentrationen signifikant unterschiedlich. Man kann also sagen, dass beide Gruppen an Zellen auf Quinin reagierten, das Verhalten der Reaktionsausmaße der CCK⁻-Zellen und CCK⁺-Zellen jedoch unterschiedlich ausfiel. Dieses unterschiedli-

che Verhalten der beiden Zelltypen könnte ein Hinweis auf mögliche zellspezifische Effekte sein. Diese lassen sich jedoch ebenfalls nicht alleine über Bitterrezeptoren erklären. Wenn zellspezifische Effekte auf glatte Muskelzellen vorliegen, scheint dies am ehesten in den niedrigeren Konzentrationen der Fall zu sein. Auf weitere mögliche Signalwege und Rezeptoren wird in den folgenden Kapiteln weiter eingegangen.

4.1.5 Desensitivierung der glatten Muskelzellen auf Bittersubstanzen nach mehrfacher Stimulation

Weiterhin bleibt die Frage zu klären, warum die glatten Muskelzellen sowohl auf Quinin, als auch auf DXM auf die höheren Konzentrationen weniger stark reagieren als auf die niedrigen oder mittleren. Eine mögliche Erklärung dazu wäre, dass es sich um eine Desensitivierung und damit um einen rezeptorvermittelten Effekt handeln könnte. Eine Desensitivierung glatter Muskelzellen auf repetitive Stimuli mit bestimmten Agonisten wurde bereits für unterschiedlichste Substanzen in verschiedenen Organen beobachtet [7]. Um dem weiter auf den Grund zu gehen, wurden die glatten Muskelzellen direkt nach Identifizierung mit CCK mit den Maximalkonzentrationen der Testsubstanzen stimuliert.

Insbesondere für Den zeigte sich hier, dass nach direkter Gabe der Maximalkonzentration Den 1×10^{-3} M das Reaktionsausmaß der glatten Muskelzellen höher war als das nach vorheriger Gabe der Konzentrationsreihe. Im statistischen Vergleich zeigte sich hier ein signifikanter Unterschied, was man als einen Hinweis auf eine mögliche Desensitivierung betrachten kann. Auffällig war allerdings auch, dass nach der Gabe der Maximalkonzentration Den die Reaktion auf eine anschließende Gabe CCK deutlich geringer ausfiel als auf eine vorherige Gabe von CCK. Daher sind auch gewisse toxische Effekte nicht auszuschließen, welche möglicherweise ebenfalls zu einem unspezifischen Kalziumanstieg führen können. In der 2015 von Wen et al. veröffentlichten Arbeit zu den schädlichen Effekten von Den wurde mit einer Konzentration von Den 2×10^{-3} M gearbeitet, die in Epithelzellen der Atemwege zur Apoptose führte und die Mitochondrien schädigte [143]. Die in dieser Arbeit verwendete Den-Maximalkonzentration war jedoch geringer. Da es in dieser Arbeit allerdings in erster Linie um die glatten Muskelzellen der Gallenblase und nicht um Epithelzellen der Atemwege ging, sind toxische Effekte auch schon in geringeren Konzentrationen weiterhin denkbar. In einer anderen Arbeit wurden Messungen an glatten Muskelzellen der Atemwege durchgeführt. Dabei kam es in den glatten Muskelzellen nach Stimulation mit unter anderem Den 1×10^{-3} M und Quinin 1×10^{-3} M

zur Relaxation der Zellen, welche vollständig reversibel war [27]. Diese Reversibilität spräche in dem Fall eher gegen eine stärkere Toxizität von Den in der entsprechenden Dosis. Eine Desensitivierung ist in dem Falle zwar nicht untersucht, jedoch möglich.

Im Falle von DXM zeigte sich in den Vergleichen der Reaktionsausmaße nach Gabe der Konzentrationsreihe und nach direkter Gabe der Maximalkonzentration kein signifikanter Unterschied, was gegen eine Desensitivierung als Ursache des abnehmenden Reaktionsausmaßes spricht. Im Falle von Quinin verhielt es sich jedoch anders. Hier zeigte sich ein stärkerer Anstieg des intrazellulären Kalziums nach direkter Gabe der Maximalkonzentration Quinin als nach vorheriger Gabe der Konzentrationsreihe. In der statistischen Testung ergab sich sogar ein signifikanter Unterschied, was für eine Desensitivierung sprechen würde. Upadhyaya et al. untersuchten ebenfalls Quinin auf mögliche Desensitivierungseffekte [133]. Sie fanden heraus, dass eine Vorbehandlung mit Quinin zu einem verminderten Kalziumanstieg nach weiterer Zugabe von Quinin führt. Dieser Effekt konnte für andere getestete Bittersubstanzen nicht nachgewiesen werden. Man würde erwarten, dass dieser Effekt mit einer Internalisierung von Bitterrezeptoren einhergeht und damit zu geringeren Reaktionsausmaßen führt. Stattdessen nimmt jedoch die Dichte an T2R4 zu, wenn die Zellen zuvor mit Quinin behandelt werden. Dies wurde mit einer möglichen Chaperon-Aktivität von Quinin erklärt, welche unabhängig von seiner Aktivität als Bitteragonist ablaufe [133]. Wie auch bei Den fiel das Reaktionsausmaß auf eine anschließende Gabe CCK jedoch deutlich geringer aus als das auf die vorherige Gabe, sodass auch in diesem Fall gewisse toxische Effekte nicht auszuschließen sind. Gleichzeitig stellten Upadhyaya et al. jedoch ebenfalls fest, dass eine Vorbehandlung mit Quinin auch zu einem verminderten Kalziumanstieg weiterer Testsubstanzen führt [133], sodass auch denkbar wäre, dass durch die Gabe von Quinin insgesamt eine geringere Reaktivität der Zelle ausgelöst wird. In einer früheren Arbeit wurden die elektrophysiologischen Effekte von Quinin auf spannungsabhängige Ionenkanäle in Geschmacksrezeptorzellen der Ratte untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass Quinin in geringen Konzentrationen (1×10^{-5} M) die Kalziumströme zu fördern schien, während es diese in höheren Konzentrationen (1×10^{-4} M) eher unterdrückte [20]. Diese Beobachtungen decken sich in gewisser Weise mit denen dieser Arbeit und wären ebenfalls eine mögliche Erklärung dafür, warum der Kalziumanstieg nach erneuter CCK-Gabe deutlich schwächer ausgeprägt ist, denn auch glatte Muskelzellen besitzen spannungsgesteuerte Kalziumkanäle. Möglicherweise wurden diese durch die hohe Dosis Quinin beeinflusst,

sodass ein Kalziumanstieg nach CCK-Gabe verhindert wurde. Für einen endgültigen Beweis wären weitere Untersuchungen notwendig.

4.2 Involvierung von Elementen der Geschmackstransduktionskaskade in die Effekte von Bittersubstanzen auf die glatte Muskulatur

4.2.1 Abhängigkeit der Kalziumanstiege in glatten Muskelzellen von TRPM5

Es wurden bereits mindestens vier verschiedene Mechanismen beschrieben, die zu einem bitteragonist-vermitteltem Anstieg des intrazellulären Kalziums führen können. Zum einen der TAS2R/ β,γ -gustducin/PLC β 2/IP3-Signalweg, über den Kalzium aus den intrazellulären Speichern des endoplasmatischen Retikulums freigesetzt wird [89]. Weiterhin wurde der TAS2R/ α -gustducin/cAMP-Signalweg beschrieben, der zu einem Kalzium-Einstrom und einer Membrandepolarisation der Geschmackszelle führt [56]. Außerdem wurde eine direkte Inhibition von Kaliumkanälen beschrieben sowie eine direkte, nicht-selektive Kationen-Kanal-Aktivierung [3, 129]. Jeden einzelnen dieser Signalwege zu deaktivieren, um eine verlässliche Aussage über die Signalwege der bitterstoffvermittelten Kalziumanstiege zu gewinnen, erscheint daher schwierig [143]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde auf den TRPM5-Kanal fokussiert.

Der TRPM5-Kanal ist ein wichtiger Bestandteil der kanonischen Geschmackstransduktionskaskade und wurde bereits in zahlreichen extraoralen Organen und Geweben nachgewiesen. In dieser Arbeit wurde die Frage untersucht, ob die Reaktionen der glatten Muskelzellen der Gallenblase in einem Zusammenhang mit dem Vorhandensein von TRPM5 stehen. Der Zusammenhang zwischen der Konzentration des intrazellulären Kalziums und dem TRPM5-Kanal liegt zunächst darin, dass eine geringe Erhöhung des intrazellulären Kalziums den TRPM5-Kanal aktiviert [99]; [149]. Es handelt sich also um einen kalzium-aktivierten, nichtselektiven Kationenkanal. In seiner aktivierten Form bewirkt dieser Kanal eine Membrandepolarisation und ist somit auch an der Regulation der Konzentration des intrazellulären Kalziums involviert [25, 40, 51]. Hollehorst et al. konnten zeigen, dass es über die Geschmackstransduktionskaskade und damit auch über TRPM5 vermittelt in Bürstenzellen der Trachea zu einer Ausschüttung von Acetylcholin kommt, welche wiederum über die muskarinischen Rezeptoren M1R und M3R zu einem Anstieg des intrazellulären Kalziums führt [41]. Durch ein Ausschalten von TRPM5 in TRPM5-KO-Mäusen konnte diese Ausschüttung von Acetylcholin und damit auch der

Anstieg des intrazellulären Kalziums signifikant reduziert werden [41]. Auch in weiteren Arbeiten konnte nach Inhibition des TRPM5-Kanals durch Triphenylphosphanoxid eine signifikante Reduktion des Kalziumanstiegs in Geschmackszellen und Bürstenzellen der Urethra beobachtet werden [25, 91]. Wenn der Kalziumanstieg nach Bittersubstanzgabe in den glatten Muskelzellen also abhängig von TRPM5 wäre, müsste dieser in Abwesenheit von TRPM5 deutlich geringer ausfallen. Um das zu untersuchen, wurden TRPM5-KO- und TRPM5-WT-Mäuse verwendet. Verglich man lediglich die Reaktionen der glatten Muskelzellen auf CCK der genetisch veränderten Mausstämmen mit den Reaktionsausmaßen der C57BL/6J-Mäuse, fiel auf, dass die genetischen veränderten Mausstämmen insgesamt, also auch im Wildtyp, ein deutlich niedrigeres Reaktionsniveau aufwiesen. Die Kalziumanstiege verliefen oft eher mit einem langsamen Anstieg und Abfall, teilweise ohne klaren Gipfel. Daher wurde auf einen Vergleich dieser Mausstämmen mit den C57BL/6J-Mäusen verzichtet.

Da die Reaktionen auf Den bereits bei den C57BL/6J-Mäusen unspezifisch ausfielen, wurde auf eine weitere Testung an den genetisch veränderten Mausstämmen verzichtet. Eine wichtige Beobachtung war, dass es bei Testung der TRPM5-KO-Mäuse sowohl auf Quinin als auch auf DXM sowohl in der Gruppe der CCK⁺-Zellen als auch in der Gruppe der CCK⁻-Zellen Anstiege des intrazellulären Kalziums gab. Sollten die Kalziumanstiege also in einem Zusammenhang mit TRPM5 stehen, so wären dennoch weitere Auslöser für einen Kalziumanstieg vorhanden. Eine interessante Beobachtung fand sich im Vergleich zwischen den CCK⁻-Zellen und den CCK⁺-Zellen der TRPM5-KO-Mäuse auf DXM. Hier reagierten die CCK⁺-Zellen sogar signifikant stärker als die CCK⁻-Zellen. Das spricht zum einen gegen TRPM5-vermittelte Effekte in CCK⁺-Zellen und zum anderen für möglicherweise zellspezifische Effekte von DXM auf die CCK⁺-Zellen, wobei hier die genaue Signalkaskade unklar bleibt. Eine weitere Erklärung wären TRPM5-vermittelte Effekte auf CCK⁻-Zellen und damit eine geringere Kalziumreaktion dieser Zellen in TRPM5-KO-Mäusen. Die CCK⁺-Zellen der TRPM5-WT-Mäuse reagieren auf geringe DXM-Konzentrationen signifikant schwächer als die Zellen der TRPM5-KO-Mäuse. Betrachtet man nur die CCK⁻-Zellen, zeigt sich ein umgekehrtes Bild. Hier reagieren zumindest auf die mittleren DXM-Konzentrationen die Zellen der TRPM5-WT-Mäuse signifikant stärker. Im Falle der CCK⁻-Zellen, unter denen sich auch die Bürstenzellen befinden, sind also TRPM5-vermittelte Effekte nicht ausgeschlossen.

Im Vergleich der Reaktionen der CCK⁺-Zellen der TRPM5-KO- und WT-Mäuse auf Quinin zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Wie auch bereits die Effekte auf DXM, scheinen die Effekte der CCK⁺-Zellen auf Quinin in keinem Zusammenhang mit dem TRPM5-Kanal zu stehen. Die CCK⁻-Zellen reagieren unabhängig vom Genotyp in etwa gleich stark, wobei die Reaktionen der CCK⁻-Zellen der TRPM5-KO-Mäuse in der Tendenz etwas stärker reagierten als die Zellen der WT-Mäuse. Verglichen mit den CCK⁺-Zellen der TRPM5-KO-Mäuse reagierten die CCK⁻-Zellen der TRPM5-KO-Mäuse etwas schwächer, auf hohe Konzentrationen Quinin sogar signifikant schwächer. Das könnte ein Hinweis auf zellspezifische Effekte von Quinin in hohen Konzentrationen sein, welche jedoch unabhängig von TRPM5 sind.

Parallel wurden in der Arbeitsgruppe Organbad-Experimente an vorkontrahierten Gallenblasen von Mäusen durchgeführt, welche mit den auch in dieser Arbeit verwendeten Bittersubstanzen stimuliert wurden. Es zeigte sich nach Gabe aller Substanzen eine konzentrationsabhängige Relaxation der Gallenblase, welche ebenfalls in TRPM5-KO-Mäusen, in TAS2R143/135/126-KO-Mäusen und in Pou2f3-KO-Mäusen, einem Mausstamm, welcher keine Bürstenzellen besitzt, auftrat (Keshavarz et al., in Vorbereitung). Bittersubstanzen führten also zu einer dosisabhängigen Relaxation der glatten Muskulatur der Gallenblase, unabhängig von Bürstenzellen und unabhängig von TRPM5 sowie der Bitterrezeptoren TAS2R 143, 135 und 126 (Keshavarz et al. in Vorbereitung).

Pulkkinen et al. testeten Bittersubstanzen an glatter Muskulatur von Meerschweinchen-Tracheen [100]. Sie konnten Bitterrezeptoren in dieser glatten Muskulatur nachweisen und konnten zeigen, dass eine Stimulation unter anderem mit Den und Chloroquin zu einer Relaxation führt. Diese Effekte wurden als direkte Effekte auf die glatte Muskulatur gewertet. Interessanterweise unterschieden sich die Effekte von Chloroquin und Den in einigen Punkten. Die durch Den verursachte Relaxation der glatten Muskulatur konnte durch verschiedene Inhibitoren gehemmt werden, was dafür spricht, dass Den hier einen bestimmten intrazellulären Signalweg adressiert. Die Wirkung von Chloroquin hingegen konnte durch diese Inhibitoren jedoch nicht aufgehoben werden, was für das Vorhandensein weiterer Signalmechanismen spricht [100]. Es wurden also bitterstoffvermittelte Effekte auf glatte Muskulatur beschrieben, möglicherweise sogar über Bitterrezeptoren vermittelt, ohne Involvierung eines G-Protein gekoppelten Signalwegs, also auch ohne die Geschmackstransduktionskaskade. Eine abschließende Erklärung, über welchen Signalweg es in glatten Muskelzellen der Gallenblase TRPM5-unabhängig nach Bitterstimu-

lation zu einem Kalziumanstieg kommt, ist damit noch nicht gefunden. Denkbar wären G-protein-unabhängige Aktivierungen von Ionenkanälen [33, 115].

4.2.2 Elemente der Geschmackstransduktionskaskade in glatter Muskulatur

Aus der In silico-Analyse wurde ersichtlich, dass die glatte Muskulatur der Gallenblase keine Bitterrezeptoren besitzt. Um zu prüfen, ob dennoch Teile der Geschmackstransduktionskaskade vorliegen, wurde die glatte Muskulatur mittels Immunhistochemie untersucht. Untersucht wurden TRPM5, die α -Untereinheit des Gustducins (GNAT) und PLC β 2. Zur Identifikation von Bürstenzellen wurde ein Antikörper gegen ChAT verwendet. Zur Identifikation der glatten Muskulatur wurde ein Antikörper gegen SMA verwendet. Im Rahmen dieser Arbeit konnten über immunhistochemische Methoden keine der untersuchten Teile der Geschmackskaskade in der glatten Muskulatur der Gallenblase nachgewiesen werden. In anderen Organen, wie beispielsweise der Trachea, konnten in glatter Muskulatur Bitterrezeptoren nachgewiesen werden [100]. Kaske et al. führten immunhistochemische Färbungen zur Identifikation von TRPM5 durch und fanden den Kanal in Epithelzellen unterschiedlicher Gewebe. In glatter Muskulatur konnten sie jedoch ebenfalls kein TRPM5 nachweisen [51]. In früheren Arbeiten konnten TRPM5 und ChAT in Bürstenzellen des Gastrointestinaltraktes und der Gallenblase nachgewiesen werden, auch hier jedoch ohne Nachweis in der glatten Muskulatur [118], was sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit deckt. Bitterrezeptoren wurden zwar in glatter Muskulatur der Atemwege nachgewiesen, α -gustducin, was in Geschmackszellen typischerweise mit Bitterrezeptoren in engem Zusammenhang steht, jedoch nicht, sodass auch hier andere Signalwege als wahrscheinlich angesehen wurden [54]. Anders verhält es sich mit der PLC β 2. Diese konnte in vaskulärer glatter Muskulatur, der Leber und im Gehirn von Ratten nachgewiesen werden [61]. Im Rahmen dieser Arbeit fand sich jedoch kein Nachweis der PLC β 2 in glatter Muskulatur der Gallenblase. In Anbetracht dieser Ergebnisse erscheint also ein direkter Zusammenhang zwischen den Kalziumreaktionen der glatten Muskelzellen der Gallenblase auf Bittersubstanzen und der kanonischen Geschmackstransduktionskaskade und Bitterrezeptoren unwahrscheinlich.

5. Schlussfolgerungen

Glatte Muskulatur ist ein wesentlicher Bestandteil in vielen Organen und sorgt über humorale und neuronale unwillkürliche Steuerung für überlebenswichtige Körperfunktionen, wie die Aufrechterhaltung eines Gefäßtonus [35], Transport von Nahrungsbestandteilen im Magen-Darm-Trakt [49] und eben auch Entleerung der Galle in das Duodenum [50, 92]. Es wurden bereits verschiedene Effekte von Bittersubstanzen auf unterschiedliche Organe diskutiert, die entweder mit direkten oder indirekten Einflüssen von Bittersubstanzen auf glatte Muskelzellen in Verbindung stehen [25, 59, 74]. Durch Bittersubstanzen sollen wichtige Schutzreflexe eingeleitet werden, die einer Besiedlung mit schädlichen Bakterien oder Parasiten entgegenwirken sollen. Auch im Bereich der Pharmakotherapie wurde ein Nutzen der bitterstoffvermittelten Effekte im Bereich der Atemwege zur Therapie des Asthma bronchiale bereits diskutiert [27, 86].

Die Gallenblase ist durch ihren engen Kontakt zum Duodenum einer ständigen Gefahr durch ascendierende Keime ausgesetzt. Über die Rolle von Bittersubstanzen in der Abwehr gegen diese Keime ist bisher noch nicht viel bekannt. In der Urethra konnten büstenzellvermittelte Effekte auf die glatte Muskulatur der Harnblase beobachtet werden [25]. Speziell in der Gallenblase scheinen Bittersubstanzen jedoch direkte Effekte auf unterschiedliche Zellgruppen auszuüben. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Bittersubstanzen sowohl Effekte auf glatte Muskelzellen, als auch auf weitere Zellgruppen der Gallenblase ausüben. Dabei scheint im Falle der Reaktion der glatten Muskelzellen der TRPM5-Kanal als Bestandteil der kanonischen Geschmackstransduktionskaskade keine Rolle zu spielen. In der Arbeitsgruppe wurden in Organbadversuchen Hinweise gefunden, dass diese Reaktionen weiterhin unabhängig von Bürstenzellen und von bestimmten Bitterrezeptoren sind. Für indirekt über Bürstenzellen vermittelte Effekte auf die glatte Muskulatur fanden sich auch in dieser Arbeit keine Hinweise, da die glatten Muskelzellen unmittelbar nach Stimulusgabe eine Reaktion zeigten. Bitterrezeptoren und der TRPM5-Kanal konnten in anderen Zelltypen der Gallenblase nachgewiesen werden. Dennoch zeigten sich auch in TRPM5-KO-Mäusen Reaktionen auf Bittersubstanzen. Effekte über Bitterrezeptoren und die kanonische Geschmackstransduktionskaskade sind damit zwar nicht ausgeschlossen, allerdings müssen auch noch weitere Signalkaskaden und Rezeptoren eine Rolle spielen. Es ist ebenfalls nicht ausgeschlossen, dass in der Gallenblase andere Signalkoppelungen vorliegen als in den Geschmackszellen der Zunge.

Um den genauen Mechanismus hinter den bitterstoffvermittelten Kalziumanstiegen zu verstehen, sind weitere Forschungsarbeiten notwendig.

6. Zusammenfassung

Die Gallenblase dient der Speicherung und Konzentrierung der in der Leber produzierten Gallensäuren und zur fraktionierten Freisetzung in das Duodenum nach Aufnahme fett-haltiger Nahrung. Im Gallenblasenepithel konnte eine hohe Dichte cholinergischer Bürstenzellen ausgemacht werden, welche Teile der kanonischen Geschmackstransduktionskaskade besitzen und bitterstoffvermittelte Reflexe einleiten sollen, um die Gallenblase vor schädlichem Mikrobiom zu schützen. Es wurden jedoch auch bereits in Organen, wie beispielsweise der Trachea und der Urethra, direkte bitterstoffvermittelte Effekte auf die glatte Muskulatur, auch unabhängig von Bürstenzellen, beschrieben. Ziel dieser Arbeit war es, anhand der glatten Muskulatur der Gallenblase die Mechanismen und Effekte ausgelöst durch Bittersubstanzen genauer zu verstehen.

Durch Kalziummessungen am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop konnte gezeigt werden, dass Bittersubstanzen präferiert, jedoch nicht exklusiv, zu einem Anstieg des intrazellulären Kalziums in glatten Muskelzellen führen. Als glatte Muskelzellen wurden alle solche definiert, die mit einem Anstieg des intrazellulären Kalziums von mind. 10 % auf CCK reagierten (CCK⁺-Zellen). Alle weiteren wurden als CCK⁻-Zellen beschrieben. Dabei stellte sich insbesondere Den als eine Art „Dirty Substance“ heraus, auf die keine der Zelltypen spezifisch und ohne klare Dosisabhängigkeit zu reagieren schien. Auf DXM und Quinin schien es gewisse konzentrationsabhängige und auch zellspezifische Effekte, zugunsten der CCK⁺-Zellen zu geben. Insbesondere nach Quinin-Gabe waren jedoch nach repetitiver Gabe Desensibilisierungseffekte zu beobachten. Durch Kalziummessungen an TRPM5-KO- und den entsprechenden WT-Mäusen stellte sich heraus, dass der TRPM5-Kanal die Reaktionsausmaße der CCK⁺-Zellen nicht beeinflusst und die der CCK⁻-Zellen nur in geringem Maße. Immunhistochemisch und in der *In silico*-Expressionsanalyse eines verfügbaren Datensatzes von Einzelzell-RNA-Sequenzierungen ließen sich in glatten Muskelzellen der Gallenblase keine Komponenten der kanonischen Geschmackstransduktionskaskade oder Bitterrezeptoren nachweisen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Bitterstoffe direkte Effekte auf die glatte Muskulatur bewirken, die unabhängig von dem TRPM5-Kanal und damit auch mutmaßlich unabhängig von der kanonischen Geschmackstransduktionskaskade sind. Auch wenn

einige wenige Bitterrezeptoren in der Gallenblase gefunden werden konnten, konnten diese speziell in glatten Muskelzellen nicht nachgewiesen werden. Falls es sich also um rezeptorvermittelte Effekte handelt, sind diese nicht durch Bitterrezeptoren zu erklären. Über welche Mechanismen genau es zu diesem Kalziumanstieg kommt, ist weiterhin unklar. Möglicherweise spielen toxisch vermittelte Effekte oder eine Mechanosensibilität der Zellen eine Rolle. Dass durch das Vorhandensein von Bitterstoffen Schutzreflexe in der Gallenblase ausgelöst werden ist jedoch weiterhin denkbar. Die dem zugrunde liegenden Signalmechanismen bleiben jedoch zunächst ungeklärt.

7. Summary

The gallbladder serves to store and concentrate bile acids produced in the liver and to fractionally release them into the duodenum after ingestion of fatty food. A high density of cholinergic brush cells has been identified in the gallbladder epithelium, which possess parts of the canonical taste transduction cascade and are thought to initiate bitter-mediated reflexes to protect the gallbladder from harmful microbiome. However, direct bitter-mediated effects on smooth muscle have also been found in organs such as the trachea and urethra, even independent of brush cells. The aim of this work was to understand the mechanisms and effects triggered by bitter substances using the gallbladder smooth muscle.

By measuring calcium with a confocal laser scanning microscope, it could be shown that bitter substances preferentially, but not exclusively, lead to an increase in intracellular calcium in smooth muscle cells. Smooth muscle cells were defined as those that responded to CCK with an increase in intracellular calcium of at least 10 % (CCK⁺ cells). All other cells were categorized as CCK⁻ cells. Den in particular was found to be a "dirty substance" to which none of the cell types appeared to respond specifically and without clear dose dependence. To DXM and quinine, there seemed to be certain concentration-dependent and also cell-specific effects in favor of CCK⁺ cells. However, especially after quinine administration, desensitization effects were observed after repetitive application. Calcium measurements in TRPM5-KO and the corresponding WT mice revealed that the TRPM5 channel did not affect the response extent of CCK⁺ cells and that of CCK⁻ cells only to a minor extent. Immunohistochemistry and *in silico* expression analysis of an available dataset of single-cell RNA sequencing did not detect any components of the canonic taste transduction cascade or bitter receptors in gallbladder smooth muscle cells.

The results of this work show that bitter compounds cause direct effects on smooth muscle cells that are independent of the TRPM5 channel and thus presumably independent of the canonical taste transduction cascade. Although a few bitter receptors were found in the gallbladder, they could not be detected specifically in smooth muscle cells. Thus, if the increase in calcium is a receptor-mediated effect, it cannot be explained by bitter receptors. The exact mechanisms by which this increase in intracellular calcium occurs remain unclear. Toxic mediated effects or a mechanosensitivity of the cells can be discussed. However, it is still conceivable that the presence of bitter substances triggers protective reflexes in the gallbladder. The signaling mechanisms behind this remain unclear for the time being.

Literaturverzeichnis

- [1] J. N. Abelson, M. I. Simon, and W. E. Balch, Eds. 2000. *Regulators and Effectors of Small GTPases, Part D: Rho Family*. . Methods in Enzymology, v.325. Elsevier textbooks, s.l.
- [2] E. Adler, M. A. Hoon, K. L. Mueller, J. Chandrashekar, N. J. Ryba, and C. S. Zuker. 2000. A Novel Family of Mammalian Taste Receptors. *Cell* 100, 6, 693–702. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80705-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80705-9).
- [3] M. Akabas, J. Dodd, and Q. al-Awqati. 1990. Identification of electrophysiologically distinct subpopulations of rat taste cells. *The Journal of membrane biology* 114, 1, 71–78. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF01869386>.
- [4] M. D. Álvarez-Santos, M. Álvarez-González, S. Estrada-Soto, and B. Bazán-Perkins. 2020. Regulation of Myosin Light-Chain Phosphatase Activity to Generate Airway Smooth Muscle Hypercontractility. *Frontiers in physiology* 11, 701. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00701>.
- [5] A. Arner and U. Malmqvist. 1998. Cross-bridge cycling in smooth muscle: a short review. *Acta physiologica Scandinavica* 164, 4, 363–372. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-201x.1998.tb10694.x>.
- [6] B. Avau, A. Rotondo, T. Thijs, C. N. Andrews, P. Janssen, J. Tack, and I. Depoortere. 2015. Targeting extra-oral bitter taste receptors modulates

- gastrointestinal motility with effects on satiation. *Scientific Reports* 5, 15985. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep15985>.
- [7] B. Avner and J. Jenne. 1981. Desensitization of isolated human bronchial smooth muscle to β -receptor agonists. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 68, 1, 51–57. DOI: [https://doi.org/10.1016/0091-6749\(81\)90123-8](https://doi.org/10.1016/0091-6749(81)90123-8).
- [8] A. A. Bachmanov and G. K. Beauchamp. 2007. Taste receptor genes. *Annual review of nutrition* 27, 389–414. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.26.061505.111329>.
- [9] F. Basset, J. Poirier, M. Le Crom, and J. Turiaf. 1971. Etude ultrastructurale de l'épithélium bronchiolaire humain. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie (Vienna, Austria : 1948)* 116, 3, 425–442.
- [10] C. A. Batt and M. L. Tortorello, Eds. 2014. *Encyclopedia of food microbiology*. Elsevier; Academic Press, London, England.
- [11] C. D. Benham, T. B. Bolton, and R. J. Lang. 1985. Acetylcholine activates an inward current in single mammalian smooth muscle cells. *Nature* 316, 6026, 345–347. DOI: <https://doi.org/10.1038/316345a0>.
- [12] M. J. Berridge. 1997. Elementary and global aspects of calcium signalling. *The Journal of physiology* 499 (Pt 2), 291–306. DOI: <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1997.sp021927>.
- [13] P. A. S. Breslin and L. Huang. 2006. Human taste: peripheral anatomy, taste transduction, and coding. *Advances in oto-rhino-laryngology* 63, 152–190. DOI: <https://doi.org/10.1159/000093760>.
- [14] A. Brockhoff, M. Behrens, M. Y. Niv, and W. Meyerhof. 2010. Structural requirements of bitter taste receptor activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 24, 11110–11115. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0913862107>.
- [15] M. A. Buck and C. M. Fraser. 1990. Muscarinic acetylcholine receptor subtypes which selectively couple to phospholipase C: Pharmacological and biochemical properties. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 173, 2, 666–672. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(05\)80087-7](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(05)80087-7).

- [16] A. Caicedo, E. Pereira, R. F. Margolskee, and S. D. Roper. 2003. Role of the G-Protein Subunit α -Gustducin in Taste Cell Responses to Bitter Stimuli. *J. Neurosci.* 23, 30, 9947–9952. DOI: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-30-09947.2003>.
- [17] A. Caicedo and S. D. Roper. 2001. Taste receptor cells that discriminate between bitter stimuli. *Science (New York, N.Y.)* 291, 5508, 1557–1560. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1056670>.
- [18] J. D. Carmichael, S. J. Winder, M. P. Walsh, and G. J. Kargacin. 1994. Calponin and smooth muscle regulation. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 72, 11, 1415–1419. DOI: <https://doi.org/10.1139/y94-204>.
- [19] J. Chandrashekar, K. L. Mueller, M. A. Hoon, E. Adler, L. Feng, W. Guo, C. S. Zuker, and N. J. Ryba. 2000. T2Rs function as bitter taste receptors. *Cell* 100, 6, 703–711. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80706-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80706-0).
- [20] Y. Chen and M. S. Herness. 1997. Electrophysiological actions of quinine on voltage-dependent currents in dissociated rat taste cells. *Pflügers Arch* 434, 3, 215–226. DOI: <https://doi.org/10.1007/s004240050388>.
- [21] D. E. Clapham and E. J. Neer. 1997. G protein beta gamma subunits. *Annual review of pharmacology and toxicology* 37, 167–203. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.37.1.167>.
- [22] T. R. Clapp, K. F. Medler, S. Damak, R. F. Margolskee, and S. C. Kinnamon. 2006. Mouse taste cells with G protein-coupled taste receptors lack voltage-gated calcium channels and SNAP-25. *BMC biology* 4, 7. DOI: <https://doi.org/10.1186/1741-7007-4-7>.
- [23] T. R. Clapp, L. M. Stone, R. F. Margolskee, and S. C. Kinnamon. 2001. Immunocytochemical evidence for co-expression of Type III IP3 receptor with signaling components of bitter taste transduction. *BMC neuroscience* 2, 6. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2202-2-6>.
- [24] M. L. Collier, G. Ji, Y. Wang, and M. I. Kotlikoff. 2000. Calcium-induced calcium release in smooth muscle: loose coupling between the action potential and calcium release. *The Journal of general physiology* 115, 5, 653–662. DOI: <https://doi.org/10.1085/jgp.115.5.653>.

- [25] K. Deckmann, K. J. Filipski, G. Krasteva-Christ, M. Fronius, M. Althaus, A. Rafiq, T. Papadakis, L. Renno, I. Jurastow, L. Wessels, M. Wolff, B. Schütz, E. Weihe, V. Chubanov, T. Gudermann, J. Klein, T. Bschleipfer, and W. Kummer. 2014. Bitter triggers acetylcholine release from polymodal urethral chemosensory cells and bladder reflexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111, 22, 8287–8292. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1402436111>.
- [26] O. Dehkordi, J. E. Rose, K. V. Balan, R. M. Millis, B. Bhatti, and A. Jayam-Trouth. 2010. Co-expression of nAChRs and molecules of the bitter taste transduction pathway by epithelial cells of intrapulmonary airways. *Life sciences* 86, 7-8, 281–288. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2009.12.016>.
- [27] D. A. Deshpande, W. C. H. Wang, E. L. McIlmoyle, K. S. Robinett, R. M. Schillinger, S. S. An, J. S. K. Sham, and S. B. Liggett. 2010. Bitter taste receptors on airway smooth muscle bronchodilate by a localized calcium flux and reverse obstruction. *Nature medicine* 16, 11, 1299–1304. DOI: <https://doi.org/10.1038/nm.2237>.
- [28] S. A. Doggrell and G. W. Scott. 1980. The occurrence of postsynaptic alpha- and beta-adrenoceptors in the guinea-pig gall bladder. *British journal of pharmacology* 71, 1, 185–189. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1980.tb10924.x>.
- [29] S. Earley. 2010. Vanilloid and melastatin transient receptor potential channels in vascular smooth muscle. *Microcirculation (New York, N.Y. : 1994)* 17, 4, 237–249. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1549-8719.2010.00026.x>.
- [30] T. E. Finger, B. Böttger, A. Hansen, K. T. Anderson, H. Alimohammadi, and W. L. Silver. 2003. Solitary chemoreceptor cells in the nasal cavity serve as sentinels of respiration. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 15, 8981–8986. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1531172100>.
- [31] T. E. Finger and S. C. Kinnamon. 2011. Taste isn't just for taste buds anymore. *F1000 biology reports* 3, 20. DOI: <https://doi.org/10.3410/B3-20>.
- [32] L. Gautron, J M. Rutkowski, M. D. Burton, W. Wei, Y. Wan, and J. K. Elmquist. 2013. Neuronal and Nonneuronal Cholinergic Structures in the Mouse Gastrointestinal Tract and Spleen. *The Journal of comparative neurology* 521, 16, 3741–3767. DOI: <https://doi.org/10.1002/cne.23376>.

- [33] J. Giraldo, N. M. Vivas, E. Vila, and A. Badia. 2002. Assessing the (a)symmetry of concentration-effect curves: empirical versus mechanistic models. *Pharmacology & Therapeutics* 95, 1, 21–45. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0163-7258\(02\)00223-1](https://doi.org/10.1016/s0163-7258(02)00223-1).
- [34] M. C. Gong, H. Fujihara, A. V. Somlyo, and A. P. Somlyo. 1997. Translocation of rhoA associated with Ca²⁺ sensitization of smooth muscle. *The Journal of biological chemistry* 272, 16, 10704–10709. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.272.16.10704>.
- [35] R. W. Grange, E. Isotani, K. S. Lau, K. E. Kamm, P. L. Huang, and J. T. Stull. 2001. Nitric oxide contributes to vascular smooth muscle relaxation in contracting fast-twitch muscles. *Physiological genomics* 5, 1, 35–44. DOI: <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.2001.5.1.35>.
- [36] B. B. Hafen and B. Burns. 2022. *StatPearls: Physiology, Smooth Muscle*, Treasure Island (FL).
- [37] D. C. Hill-Eubanks, M. E. Werner, T. J. Heppner, and M. T. Nelson. 2011. Calcium signaling in smooth muscle. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3, 9, a004549. DOI: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004549>.
- [38] H. Hiroki, M. Uemura, H. Igarashi, M. Kurohmaru, M. Kanai-Azuma, and Y. Kanai. 2018. Anatomy and development of the extrahepatic biliary system in mouse and rat: a perspective on the evolutionary loss of the gallbladder. *Journal of Anatomy* 232, 1, 134–145. DOI: <https://doi.org/10.1111/joa.12707>.
- [39] D. Hofer, B. Puschel, and D. Drenckhahn. 1996. Taste receptor-like cells in the rat gut identified by expression of alpha-gustducin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93, 13, 6631–6634. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.93.13.6631>.
- [40] T. Hofmann, V. Chubanov, T. Gudermann, and C. Montell. 2003. TRPM5 is a voltage-modulated and Ca(2+)-activated monovalent selective cation channel. *Current biology : CB* 13, 13, 1153–1158. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(03\)00431-7](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(03)00431-7).
- [41] M. I. Hollenhorst, I. Jurastow, R. Nandigama, S. Appenzeller, L. Li, J. Vogel, S. Wiederhold, M. Althaus, M. Empting, J. Altmüller, A. K. H. Hirsch, V. Flockerzi,

- B. J. Canning, A. Saliba, and G. Krasteva-Christ. 2020. Tracheal brush cells release acetylcholine in response to bitter tastants for paracrine and autocrine signaling. *The FASEB Journal* 34, 1, 316–332. DOI: <https://doi.org/10.1096/fj.201901314RR>.
- [42] B. Hoover, V. Baena, M. M. Kaelberer, F. Getaneh, S. Chinchilla, and D. V. Bohórquez. 2017. The intestinal tuft cell nanostructure in 3D. *Scientific Reports* 7, 1, 1652. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01520-x>.
- [43] C. Housset, Y. Chrétien, D. Debray, and N. Chignard. 2016. Functions of the Gallbladder. *Comprehensive Physiology* 6, 3, 1549–1577. DOI: <https://doi.org/10.1002/cphy.c150050>.
- [44] A. L. Huang, X. Chen, M. A. Hoon, J. Chandrashekar, W. Guo, D. Tränkner, N. J. P. Ryba, and C. S. Zuker. 2006. The cells and logic for mammalian sour taste detection. *Nature* 442, 7105, 934–938. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature05084>.
- [45] Y. A. Huang, Y. Maruyama, R. Stimac, and S. D. Roper. 2008. Presynaptic (Type III) cells in mouse taste buds sense sour (acid) taste. *The Journal of physiology* 586, 12, 2903–2912. DOI: <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.151233>.
- [46] W. F. Jackson and E. M. Boerman. 2018. Voltage-gated Ca²⁺ channel activity modulates smooth muscle cell calcium waves in hamster cremaster arterioles. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 315, 4, H871–H878. DOI: <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00292.2018>.
- [47] S. Janssen, J. Laermans, P. Verhulst, T. Thijs, J. Tack, and I. Depoortere. 2011. Bitter taste receptors and α -gustducin regulate the secretion of ghrelin with functional effects on food intake and gastric emptying. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 5, 2094–2099. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1011508108>.
- [48] V. Joshi, P. R. Strege, G. Farrugia, and A. Beyder. 2021. Mechanotransduction in gastrointestinal smooth muscle cells: role of mechanosensitive ion channels. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 320, 5, G897–G906. DOI: <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00481.2020>.
- [49] H. Karaki, H. Ozaki, M. Hori, M. Mitsui-Saito, K. Amano, K. Harada, S. Miyamoto, H. Nakazawa, K. J. Won, and K. Sato. 1997. Calcium movements,

- distribution, and functions in smooth muscle. *Pharmacological reviews* 49, 2, 157–230.
- [50] C. Karaliotas, C. E. Broelsch, and N. A. Habib. 2006. *Liver and Biliary Tract Surgery: embryological anatomy to 3D-imaging and transplant innovations*. SpringerWienNewYork, Wien.
- [51] S. Kaske, G. Krasteva, P. König, W. Kummer, T. Hofmann, T. Gudermann, and V. Chubanov. 2007. TRPM5, a taste-signaling transient receptor potential ion-channel, is a ubiquitous signaling component in chemosensory cells. *BMC neuroscience* 8, 49. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2202-8-49>.
- [52] A. Katz, D. Wu, and M. I. Simon. 1992. Subunits beta gamma of heterotrimeric G protein activate beta 2 isoform of phospholipase C. *Nature* 360, 6405, 686–689. DOI: <https://doi.org/10.1038/360686a0>.
- [53] R. A. Khalil. 2010. *Rho Kinase in Vascular Smooth Muscle: Regulation of vascular smooth muscle function* (2010). Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK54588/?report=reader>.
- [54] D. Kim, J. A. Woo, E. Geffken, S. S. An, and S. B. Liggett. 2017. Coupling of Airway Smooth Muscle Bitter Taste Receptors to Intracellular Signaling and Relaxation Is via G α 1,2,3. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 56, 6, 762–771. DOI: <https://doi.org/10.1165/rcmb.2016-0373OC>.
- [55] Kline. 2019. Chloroquine, an Activator of Bitter Taste Receptors, Relaxed Male Guinea Pig Gallbladder Strips. *The FASEB Journal* 33, S1, 763.3-763.3. DOI: https://doi.org/10.1096/fasebj.2019.33.1_supplement.763.3.
- [56] S. S. Kolesnikov and R. F. Margolskee. 1995. A cyclic-nucleotide-suppressible conductance activated by transducin in taste cells. *Nature* 376, 6535, 85–88. DOI: <https://doi.org/10.1038/376085a0>.
- [57] A. Koussounadis, S. P. Langdon, I. H. Um, D. J. Harrison, and V. A. Smith. 2015. Relationship between differentially expressed mRNA and mRNA-protein correlations in a xenograft model system. *Sci Rep* 5, 1, 10775. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep10775>.
- [58] G. Krasteva, B. J. Canning, P. Hartmann, T. Z. Veres, T. Papadakis, C. Mühlfeld, K. Schliecker, Y. N. Tallini, A. Braun, H. Hackstein, N. Baal, E. Weihe, B. Schütz,

- M. Kotlikoff, I. Ibanez-Tallon, and W. Kummer. 2011. Cholinergic chemosensory cells in the trachea regulate breathing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 23, 9478–9483. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1019418108>.
- [59] G. Krasteva and W. Kummer. 2012. "Tasting" the airway lining fluid. *Histochemistry and cell biology* 138, 3, 365–383. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00418-012-0993-5>.
- [60] Y. Kureishi, S. Kobayashi, M. Amano, K. Kimura, H. Kanaide, T. Nakano, K. Kaibuchi, and M. Ito. 1997. Rho-associated kinase directly induces smooth muscle contraction through myosin light chain phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* 272, 19, 12257–12260. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.272.19.12257>.
- [61] E. F. Labelle and E. Polyák. 1996. Phospholipase C β 2 in vascular smooth muscle. *J. Cell. Physiol.* 169, 2, 358–363. DOI: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4652\(199611\)169:2<358:AID-JCP15>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4652(199611)169:2<358:AID-JCP15>3.0.CO;2-5).
- [62] C. Lasconi, S. Pifferi, A. Hernandez-Clavijo, F. Merigo, M. P. Cecchini, K. Y. Gonzalez-Velandia, E. Agostinelli, A. Sbarbati, and A. Menini. 2019. Bitter tastants and artificial sweeteners activate a subset of epithelial cells in acute tissue slices of the rat trachea. *Sci Rep* 9, 1, 8834. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45456-w>.
- [63] M. W. Lee and D. L. Severson. 1994. Signal transduction in vascular smooth muscle: diacylglycerol second messengers and PKC action. *The American journal of physiology* 267, 3 Pt 1, C659-78. DOI: <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1994.267.3.C659>.
- [64] B. Leitinger. 2014. Discoidin domain receptor functions in physiological and pathological conditions. *International review of cell and molecular biology* 310, 39–87. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800180-6.00002-5>.
- [65] R. P. Lisak, L. Nedelkoska, and J. A. Benjamins. 2014. Effects of dextromethorphan on glial cell function: proliferation, maturation, and protection from cytotoxic molecules. *Glia* 62, 5, 751–762. DOI: <https://doi.org/10.1002/glia.22639>.

- [66] P. Lu, M. K. ElMallah, Z. Liu, C. Wu, J. Chen, L. M. Lifshitz, and R. ZhuGe. 2021. Genetic deletion of the Tas2r143/Tas2r135/Tas2r126 cluster reveals that TAS2Rs may not mediate bitter tastant-induced bronchodilation. *Journal of cellular physiology*. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcp.30315>.
- [67] L. Luciano and E. Reale. 1969. A new cell type ('brush cell') in the gall bladder epithelium of the mouse. *J Submicrosc Cytol.*, 1:43-52.
- [68] L. Luciano and E. Reale. 1990. Brush cells of the mouse gallbladder. *Cell Tissue Res* 262, 2, 339–349. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00309889>.
- [69] L. Luciano, E. Reale, and H. Ruska. 1968. Über eine „chemorezeptive“ Sinneszelle in der Trachea der Ratte. *Cell Tissue Res* 85, 3, 350–375. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00328847>.
- [70] R. Lüllmann-Rauch and E. Asan. 2019. *Taschenlehrbuch Histologie*. (6th ed.). Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- [71] T. C. Lund, A. J. Kobs, A. Kramer, M. Nyquist, M. T. Kuroki, J. Osborn, D. S. Lidke, S. T. Low-Nam, B. R. Blazar, and J. Tolar. 2013. Bone marrow stromal and vascular smooth muscle cells have chemosensory capacity via bitter taste receptor expression. *PLoS ONE* 8, 3, e58945. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058945>.
- [72] M. A. Buck and C. M. Fraser. 1990. Muscarinic Acetylcholine Receptor Subtypes which selectively couple to Phospholipase C: Pharmacological and biochemical properties. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 173, 666–672.
- [73] R. Makuch, K. Birukov, V. Shirinsky, and R. Dabrowska. 1991. Functional interrelationship between calponin and caldesmon. *Biochemical Journal* 280 (Pt 1), 33–38. DOI: <https://doi.org/10.1042/bj2800033>.
- [74] M. L. Manson, J. Säfholm, M. Al-Ameri, P. Bergman, A. C. Orre, K. Swärd, A. James, S. E. Dahlén, and M. Adner. 2014. Bitter taste receptor agonists mediate relaxation of human and rodent vascular smooth muscle. *European journal of pharmacology* 740. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.005>.
- [75] R. F. Margolskee. 2002. Molecular mechanisms of bitter and sweet taste transduction. *The Journal of biological chemistry* 277, 1, 1–4. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.R100054200>.

- [76] S. B. Marston and W. Lehman. 1985. Caldesmon is a Ca^{2+} -regulatory component of native smooth-muscle thin filaments. *Biochemical Journal* 231, 3, 517–522. DOI: <https://doi.org/10.1042/bj2310517>.
- [77] G. M. Mawe. 1991. The role of cholecystokinin in ganglionic transmission in the guinea-pig gall-bladder. *The Journal of physiology* 439, 89–102. DOI: <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1991.sp018658>.
- [78] S. K. McLaughlin, P. J. McKinnon, and R. F. Margolskee. 1992. Gustducin is a taste-cell-specific G protein closely related to the transducins. *Nature* 357, 6379, 563–569. DOI: <https://doi.org/10.1038/357563a0>.
- [79] F. Merigo, D. Benati, M. Di Chio, F. Osculati, and A. Sbarbati. 2007. Secretory cells of the airway express molecules of the chemoreceptive cascade. *Cell Tissue Res* 327, 2, 231–247. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00441-006-0280-7>.
- [80] W. Meyerhof. 2005. Elucidation of mammalian bitter taste. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology* 154, 37–72. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10254-005-0041-0>.
- [81] M. A. Miyoshi, K. Abe, and Y. Emori. 2001. IP(3) receptor type 3 and PLCbeta2 are co-expressed with taste receptors T1R and T2R in rat taste bud cells. *Chemical senses* 26, 3, 259–265. DOI: <https://doi.org/10.1093/chemse/26.3.259>.
- [82] Y. Mizuno, E. Isotani, J. Huang, H. Ding, J. T. Stull, and K. E. Kamm. 2008. Myosin light chain kinase activation and calcium sensitization in smooth muscle in vivo. *American journal of physiology. Cell physiology* 295, 2, C358-64. DOI: <https://doi.org/10.1152/ajpcell.90645.2007>.
- [83] S. J. Morgan, D. A. Deshpande, B. C. Tiegs, A. M. Misor, H. Yan, A. V. Hershfeld, T. C. Rich, R. A. Panettieri, S. S. An, and R. B. Penn. 2014. β -Agonist-mediated relaxation of airway smooth muscle is protein kinase A-dependent. *The Journal of biological chemistry* 289, 33, 23065–23074. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.557652>.
- [84] M. Morroni, A. M. Cangiotti, and S. Cinti. 2007. Brush cells in the human duodenojejunal junction: an ultrastructural study. *Journal of Anatomy* 211, 1, 125–131. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2007.00738.x>.

- [85] M. S. Nadsombati, J. W. McGinty, M. R. Lyons-Cohen, J. B. Jaffe, L. DiPeso, C. Schneider, C. N. Miller, J. L. Pollack, G. A. Nagana Gowda, M. F. Fontana, D. J. Erle, M. S. Anderson, R. M. Locksley, D. Raftery, and J. v Moltke. 2018. Detection of Succinate by Intestinal Tuft Cells Triggers a Type 2 Innate Immune Circuit. *Immunity* 49, 1, 33-41.e7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.06.016>.
- [86] A. P. Nayak, S. D. Shah, J. V. Michael, and D. A. Deshpande. 2019. Bitter Taste Receptors for Asthma Therapeutics. *Frontiers in physiology* 10, 884. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00884>.
- [87] T. Ogata. 2006. Bicarbonate secretion by rat bile duct brush cells indicated by immunohistochemical localization of CFTR, anion exchanger AE2, Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter, carbonic anhydrase II, Na⁺/H⁺ exchangers NHE1 and NHE3, H⁺/K⁺-ATPase, and Na⁺/K⁺-ATPase. *Medical molecular morphology* 39, 1, 44–48. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00795-006-0312-0>.
- [88] T. Ogura, K. Krosnowski, L. Zhang, M. Bekkerman, and W. Lin. 2010. Chemoreception Regulates Chemical Access to Mouse Vomeronasal Organ: Role of Solitary Chemosensory Cells. *PLoS ONE* 5, 7. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011924>.
- [89] T. Ogura, R. F. Margolskee, and S. C. Kinnamon. 2002. Taste receptor cell responses to the bitter stimulus denatonium involve Ca²⁺ influx via store-operated channels. *Journal of neurophysiology* 87, 6, 3152–3155. DOI: <https://doi.org/10.1152/jn.2002.87.6.3152>.
- [90] C. E. O'Leary, J. Sbierski-Kind, M. E. Kotas, J. C. Wagner, H. Liang, A. W. Schroeder, J. C. de Tenorio, J. v Moltke, R. R. Ricardo-Gonzalez, W. L. Eckalbar, A. B. Molofsky, C. Schneider, and R. M. Locksley. 2022. Bile acid-sensitive tuft cells regulate biliary neutrophil influx. *Science immunology* 7, 69, eabj1080. DOI: <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abj1080>.
- [91] R. K. Palmer, Ka. Atwal, I. Bakaj, S. Carlucci-Derbyshire, M. T. Buber, R. Cerne, R. Y. Cortés, H. R. Devantier, Vi. Jorgensen, A. Pawlyk, S. P. Lee, D. G. Sprou, Z. Zhang, and R. Bryant. 2010. Triphenylphosphine oxide is a potent and selective inhibitor of the transient receptor potential melastatin-5 ion channel. *Assay and drug development technologies* 8, 6, 703–713. DOI: <https://doi.org/10.1089/adt.2010.0334>.

- [92] H. Pape, A. Kurtz, and S. Silbernagl. 2019. *Physiologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- [93] H. P. Parkman, A. P. Pagano, and J. P. Ryan. 1999. Subtypes of muscarinic receptors regulating gallbladder cholinergic contractions. *The American journal of physiology* 276, 5, G1243-50. DOI: <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1999.276.5.G1243>.
- [94] C. A. Pérez, L. Huang, M. Rong, J. A. Kozak, A. K. Preuss, H. Zhang, M. Max, and R. F. Margolskee. 2002. A transient receptor potential channel expressed in taste receptor cells. *Nature neuroscience* 5, 11, 1169–1176. DOI: <https://doi.org/10.1038/nn952>.
- [95] A. Perniss, S. Liu, B. Boonen, M. Keshavarz, A. Ruppert, T. Timm, U. Pfeil, A. Soultanova, S. Kusumakshi, L. Delventhal, Ö. Aydin, M. Pyrski, K. Deckmann, T. Hain, N. Schmidt, C. Ewers, A. Günther, G. Lochnit, V. Chubanov, T. Gudermann, J. Oberwinkler, J. Klein, K. Mikoshiba, T. Leinders-Zufall, S. Offermanns, B. Schütz, U. Boehm, F. Zufall, B. Bufe, and W. Kummer. 2020. Chemosensory Cell-Derived Acetylcholine Drives Tracheal Mucociliary Clearance in Response to Virulence-Associated Formyl Peptides. *Immunity* 52, 4, 683-699.e11. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.03.005>.
- [96] P. Portincasa, A. Di Ciaula, and G. P. vanBerge-Henegouwen. 2004. Smooth muscle function and dysfunction in gallbladder disease. *Current gastroenterology reports* 6, 2, 151–162. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11894-004-0043-0>.
- [97] T. Pozzan, R. Rizzuto, P. Volpe, and J. Meldolesi. 1994. Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiological reviews* 74, 3, 595–636. DOI: <https://doi.org/10.1152/physrev.1994.74.3.595>.
- [98] S. Prandi, A. Voigt, W. Meyerhof, and M. Behrens. 2018. Expression profiling of Tas2r genes reveals a complex pattern along the mouse GI tract and the presence of Tas2r131 in a subset of intestinal Paneth cells. *Cellular and Molecular Life Sciences* 75, 1, 49–65. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2621-y>.
- [99] D. Prawitt, M. K. Monteilh-Zoller, L. Brixel, C. Spangenberg, B. Zabel, A. Fleig, and R. Penner. 2003. TRPM5 is a transient Ca²⁺-activated cation channel responding to rapid changes in Ca²⁺_i. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 25, 15166–15171. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.2334624100>.

- [100] V. Pulkkinen, M. L. Manson, J. Säfholm, M. Adner, and S. E. Dahlén. 2012. The bitter taste receptor (TAS2R) agonists denatonium and chloroquine display distinct patterns of relaxation of the guinea pig trachea. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 303, 11. DOI: <https://doi.org/10.1152/ajplung.00205.2012>.
- [101] L. Reid, B. Meyrick, V. B. Antony, L. Chang, J. D. Crapo, and H. Y. Reynolds. 2005. The mysterious pulmonary brush cell: a cell in search of a function. *American journal of respiratory and critical care medicine* 172, 1, 136–139. DOI: <https://doi.org/10.1164/rccm.200502-203WS>.
- [102] A. Y. Rhee and F. V. Brozovich. 2000. The Smooth Muscle Cross-bridge Cycle Studied Using Sinusoidal Length Perturbations. *Biophysical journal* 79, 3, 1511–1523. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76402-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76402-2).
- [103] J. Rhodin. 1959. LXVII Ultrastructure of the Tracheal Ciliated Mucosa in Rat and Man. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 68, 4, 964–974. DOI: <https://doi.org/10.1177/000348945906800402>.
- [104] J. A. Rhodin. 1966. The ciliated cell. Ultrastructure and function of the human tracheal mucosa. *The American review of respiratory disease* 93, 3, Suppl:1-15. DOI: <https://doi.org/10.1164/arrd.1966.93.3P2.1>.
- [105] J. F. Riemann, W. Fischbach, P. R. Galle, and J. Mössner. 2008. *Gastroenterologie in Klinik und Praxis: Das Referenzwerk für Klinik und Praxis*. Grundlagen zu Gallenwegen und Gallenblase. . Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart.
- [106] C. I. Robertson, D. P. Gaffney, L. R. Chrin, and C. L. Berger. 2005. Structural rearrangements in the active site of smooth-muscle myosin. *Biophysical journal* 89, 3, 1882–1892. DOI: <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.059840>.
- [107] R. A. Romanov, R. S. Lasher, B. High, L. E. Savidge, A. Lawson, O. A. Rogachevskaja, H. Zhao, V. V. Rogachevsky, M. F. Bystrova, G. D. Churbanov, I. Adameyko, T. Harkany, R. Yang, G. J. Kidd, P. Marambaud, J. C. Kinnamon, S. S. Kolesnikov, and T. E. Finger. 2018. Chemical synapses without synaptic vesicles: Purinergic neurotransmission through a CALHM1 channel-mitochondrial signaling complex. *Science signaling* 11, 529. DOI: <https://doi.org/10.1126/scisignal.aao1815>.

- [108] P. Rössler, C. Kroner, J. Freitag, J. Noè, and H. Breer. 1998. Identification of a phospholipase C β subtype in rat taste cells. *European Journal of Cell Biology* 77, 3, 253–261. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0171-9335\(98\)80114-3](https://doi.org/10.1016/S0171-9335(98)80114-3).
- [109] L. Ruiz-Avila, S. K. McLaughlin, D. Wildman, P. J. McKinnon, A. Robichon, N. Spickofsky, and R. F. Margolskee. 1995. Coupling of bitter receptor to phosphodiesterase through transducin in taste receptor cells. *Nature* 376, 6535, 80–85. DOI: <https://doi.org/10.1038/376080a0>.
- [110] A. Ruppert, M. Keshavarz, S. Winterberg, M. Meiners, P. Hartmann, K. Fleck, A. Perniss, K. Deckmann, S. Liu, S. Offermanns, G. Krasteva-Christ, W. Kummer, and B. Schütz. 2018. *Bitter taste receptors and components of the taste transduction cascade in the mouse gall bladder* (2018). Retrieved from https://coms.events/ECRO2018/data/abstracts/en/abstract_0084.html.
- [111] J. T. Russell. 2011. Imaging calcium signals in vivo: a powerful tool in physiology and pharmacology. *British journal of pharmacology* 163, 8, 1605–1625. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00988.x>.
- [112] D. B. Sanders, T. Kelley, and D. Larson. 2000. The role of nitric oxide synthase/nitric oxide in vascular smooth muscle control. *Perfusion* 15, 2, 97–104. DOI: <https://doi.org/10.1177/026765910001500203>.
- [113] K. M. Sanders. 2001. Invited review: mechanisms of calcium handling in smooth muscles. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* 91, 3, 1438–1449. DOI: <https://doi.org/10.1152/jappl.2001.91.3.1438>.
- [114] A. Saroli. 1985. Interaction of denatonium chloride with the bitter taste receptor. *Z Lebensm Unters Forsch* 180, 3, 227–229. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF01027270>.
- [115] S. Sawano, E. Seto, T. Mori, and Y. Hayashi. 2005. G-protein-dependent and -independent pathways in denatonium signal transduction. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 69, 9, 1643–1651. DOI: <https://doi.org/10.1271/bbb.69.1643>.
- [116] A. Sbarbati and F. Osculati. 2005. A new fate for old cells: brush cells and related elements. *Journal of Anatomy* 206, 4, 349–358. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2005.00403.x>.

- [117] B. T. Schjoldager. 1994. Role of CCK in gallbladder function. *Annals of the New York Academy of Sciences* 713, 207–218. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1994.tb44067.x>.
- [118] B. Schütz, I. Jurastow, S. Bader, C. Ringer, J. von Engelhardt, V. Chubanov, T. Gudermann, M. Diener, W. Kummer, G. Krasteva-Christ, and E. Weihe. 2015. Chemical coding and chemosensory properties of cholinergic brush cells in the mouse gastrointestinal and biliary tract. *Frontiers in physiology* 6, 87. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00087>.
- [119] B. Schütz, I. Jurastow, S. Bader, C. Ringer, J. von Engelhardt, V. Chubanov, T. Gudermann, M. Diener, W. Kummer, G. Krasteva-Christ, and E. Weihe. 2015. Chemical coding and chemosensory properties of cholinergic brush cells in the mouse gastrointestinal and biliary tract. *Frontiers in physiology* 6, 87. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00087>.
- [120] B. Schütz, A. Ruppert, O. Strobel, M. Lazarus, Y. Urade, M. W. Büchler, and E. Weihe. 2019. Distribution pattern and molecular signature of cholinergic tuft cells in human gastro-intestinal and pancreatic-biliary tract. *Scientific Reports* 9. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53997-3>.
- [121] S. A. Simon, I. E. de Araujo, R. Gutierrez, and M. A. L. Nicolelis. 2006. The neural mechanisms of gustation: a distributed processing code. *Nature reviews. Neuroscience* 7, 11, 890–901. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrn2006>.
- [122] A. P. Somlyo and A. V. Somlyo. 2003. Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiological reviews* 83, 4, 1325–1358. DOI: <https://doi.org/10.1152/physrev.00023.2003>.
- [123] M. P. Sparrow, U. Mrwa, F. Hofmann, and Rüegg J. C. 1981. Calmodulin is essential for smooth muscle contraction, 125, 141–145.
- [124] A. I. Spielman, T. Huque, H. Nagai, G. Whitney, and J. G. Brand. 1994. Generation of inositol phosphates in bitter taste transduction. *Physiology & Behavior* 56, 6, 1149–1155. DOI: [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(94\)90359-X](https://doi.org/10.1016/0031-9384(94)90359-X).

- [125] B. J. Striem, U. Pace, U. Zehavi, M. Naim, and D. Lancet. 1989. Sweet tastants stimulate adenylate cyclase coupled to GTP-binding protein in rat tongue membranes. *Biochemical Journal* 260, 1, 121–126.
- [126] X. Sun, B. Yu, L. Xu, W. Dong, and H. Luo. 2006. Interstitial cells of Cajal in the murine gallbladder. *Scandinavian journal of gastroenterology* 41, 10, 1218–1226. DOI: <https://doi.org/10.1080/00365520600708800>.
- [127] X. Tan and M. J. Sanderson. 2014. Bitter tasting compounds dilate airways by inhibiting airway smooth muscle calcium oscillations and calcium sensitivity. *British journal of pharmacology* 171, 3, 646–662. DOI: <https://doi.org/10.1111/bph.12460>.
- [128] J. Toouli. 2009. Sphincter of Oddi: Function, dysfunction, and its management. *Journal of gastroenterology and hepatology* 24 Suppl 3, S57-62. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2009.06072.x>.
- [129] T. Tsunenari, Y. Hayashi, M. Orita, T. Kurahashi, A. Kaneko, and T. Mori. 1996. A quinine-activated cationic conductance in vertebrate taste receptor cells. *The Journal of general physiology* 108, 6, 515–523. DOI: <https://doi.org/10.1085/jgp.108.6.515>.
- [130] M. Uehata, T. Ishizaki, H. Satoh, T. Ono, T. Kawahara, T. Morishita, H. Tamakawa, K. Yamagami, J. Inui, M. Maekawa, and S. Narumiya. 1997. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature* 389, 6654, 990–994. DOI: <https://doi.org/10.1038/40187>.
- [131] N. Ulfig. 2019. *Kurzlehrbuch Histologie*. (5th ed.). Kurzlehrbuch. Thieme, Stuttgart.
- [132] Upadhyaya et al. 2014. Dextromethorphan Mediated Bitter Taste Receptor Activation in the Pulmonary Circuit Causes Vasoconstriction.
- [133] Upadhyaya et al., R. Chakraborty, F. A. Shaik, A. Jaggupilli, R. P. Bhullar, and P. Chelikani. 2016. The Pharmacochaperone Activity of Quinine on Bitter Taste Receptors. *PLoS ONE* 11, 5, e0156347. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156347>.

- [134] A. Vandenbeuch, T. R. Clapp, and S. C. Kinnamon. 2008. Amiloride-sensitive channels in type I fungiform taste cells in mouse. *BMC neuroscience* 9, 1. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2202-9-1>.
- [135] M. P. Walsh. 1994. Calmodulin and the regulation of smooth muscle contraction. *Molecular and cellular biochemistry* 135, 1, 21–41. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00925958>.
- [136] B. Wang, Y. Ding, C. Wang, and W. Wang. 2015. Role of ROCK expression in gallbladder smooth muscle contraction. *Molecular medicine reports* 12, 2, 2907–2911. DOI: <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.3726>.
- [137] H. H. Wang, P. Portincasa, and D. Q.-H. Wang. 2019. Update on the Molecular Mechanisms Underlying the Effect of Cholecystokinin and Cholecystokinin-1 Receptor on the Formation of Cholesterol Gallstones. *Current medicinal chemistry* 26, 19, 3407–3423. DOI: <https://doi.org/10.2174/0929867324666170619104801>.
- [138] J. Waschke, T. M. Böckers, F. Paulsen, and J. Sobotta. 2015. *Anatomie: Das Lehrbuch*. Elsevier Urban & Fischer, München.
- [139] J. H. Watson and G. L. Brinkman. 1964. Electron Microscopy of the epithelial cells of normal and bronchitic human bronchus. *The American review of respiratory disease* 90, 851–866. DOI: <https://doi.org/10.1164/arrd.1964.90.6.851>.
- [140] R. C. Webb. 2003. Smooth muscle contraction and relaxation. *Advances in physiology education* 27, 1-4, 201–206. DOI: <https://doi.org/10.1152/advan.00025.2003>.
- [141] J. W. Wegener, V. Schulla, T. Lee, A. Koller, S. Feil, R. Feil, T. Kleppisch, N. Klugbauer, S. Moosmang, A. Welling, and F. Hofmann. 2004. An essential role of Cav1.2 L-type calcium channel for urinary bladder function. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18, 10, 1159–1161. DOI: <https://doi.org/10.1096/fj.04-1516fje>.
- [142] U. Welsch, T. Deller, and W. Kummer. 2014. *Lehrbuch Histologie*. (4th ed.). Elsevier Urban & Fischer, München.
- [143] X. Wen, J. Zhou, D. Zhang, J. Li, Q. Wang, N. Feng, H. Zhu, Y. Song, H. Li, and C. Bai. 2015. Denatonium inhibits growth and induces apoptosis of airway

- epithelial cells through mitochondrial signaling pathways. *Respir Res* 16, 1, 1–9. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12931-015-0183-9>.
- [144] G. T. Wong, K. S. Gannon, and R. F. Margolskee. 1996. Transduction of bitter and sweet taste by gustducin. *Nature* 381, 6585, 796–800. DOI: <https://doi.org/10.1038/381796a0>.
- [145] S. V. Wu, N. Rozengurt, M. Yang, S. H. Young, J. Sinnott-Smith, and E. Rozengurt. 2002. Expression of bitter taste receptors of the T2R family in the gastrointestinal tract and enteroendocrine STC-1 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 4, 2392–2397. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.042617699>.
- [146] L. Yan, Q. Ouyang, and H. Wang. 2012. Dose-response aligned circuits in signaling systems. *PLoS ONE* 7, 4, e34727. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034727>.
- [147] W. Yan, G. Sunavala, S. Rosenzweig, M. Dasso, J. G. Brand, and A. I. Spielman. 2001. Bitter taste transduced by PLC-beta(2)-dependent rise in IP(3) and alpha-gustducin-dependent fall in cyclic nucleotides. *American journal of physiology. Cell physiology* 280, 4, C742-51. DOI: <https://doi.org/10.1152/ajpcell.2001.280.4.C742>.
- [148] Y. Zhang, M. A. Hoon, J. Chandrashekar, K. L. Mueller, B. Cook, D. Wu, C. S. Zuker, and N. J. Ryba. 2003. Coding of Sweet, Bitter, and Umami Tastes. *Cell* 112, 3, 293–301. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00071-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00071-0).
- [149] Z. Zhang, Z. Zhao, R. Margolskee, and E. Liman. 2007. The transduction channel TRPM5 is gated by intracellular calcium in taste cells. *J. Neurosci.* 27, 21, 5777–5786. DOI: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4973-06.2007>.
- [150] F. Zufall and S. D. Munger, Eds. 2016. *Chemosensory transduction: The detection of odors, tastes, and other chemostimuli*. Academic Press is an imprint of Elsevier, London, UK.

Publikationsverzeichnis

Originalarbeiten

Keshavarz M, Faraj Tabrizi S, Ruppert AL, Pfeil U, Schreiber Y, Klein J, Brandenburger I, Lochnit G, Bhushan S, Perniss A, Deckmann K, Hartmann P, Meiners M, Mermer P, Rafiq A, Winterberg S, Papadakis T, Thomas D, Angioni C, Oberwinkler J, Chubanov V, Gudermann T, Gärtner U, Offermanns S, Schütz B, Kummer W. „Cysteinyl leukotrienes and acetylcholine are biliary tuft cell cotransmitters.“ *Sci Immunol.* 2022 Mar 4;7(69):eabf6734. doi: 10.1126/sciimmunol.abf6734. Epub 2022 Mar 4. PMID: 35245090

Kongressbeiträge

Keshavarz M., Rafiq A., Meiners M., Hartmann P., Ruppert A.-L., Mermer P., Bakir N., Fleck K., Perniss A., Deckmann K., Soutanova A., Krasteva-Christ G., Wessler I., Klein J., Schütz B., Kummer W. „Stimulation of chemosensory brush cells triggers cholinergic contraction in the mouse gall bladder“

113. Jahresversammlung der Anatomischen Gesellschaft, Rostock, September 25-28, 2018 (Vortrag)

Ruppert A.-L., Keshavarz M., Winterberg S., Meiners M., Hartmann P., Fleck K., Perniss A., Deckmann K., Liu S., Offermanns S., Krasteva-Christ G., Kummer W., Schütz B. „Expression of bitter taste receptors and components of the taste transduction cascade is restricted to chemosensory cells in the mouse gall bladder“

113. Jahresversammlung der Anatomischen Gesellschaft, Rostock, September 25-28, 2018 (Poster)

Ruppert, A.; Keshavarz, M.; Winterberg, S.; Meiners, M.; Hartmann, P.; Fleck, K. et al.: „Bitter taste receptors and components of the taste transduction cascade in the mouse gall bladder.“ Hg. v. Institut of Anatomy and Cell Biology Philipps-University, Marburg, Institut of Anatomy and Cell Biology Justus-Liebig-University, Gießen, Max Planck Institute for Heart and Lung Research, Bad Nauheim und Institute of Anatomy and Cell

Biology Saarland University, Homburg/Saar, 2018. Online verfügbar unter https://coms.events/ECRO2018/data/abstracts/en/abstract_0084.html.

Keshavarz, M., Meiners, M., Liu, S., Hartmann, P., Bakir, N.J., Perniss, A., Deckmann, K., Offermanns, S., & Kummer, W. (2018). „Bitter taste receptor agonists mediate contraction and relaxation in murine gallbladder smooth muscle.“

XXVIIth Annual Meeting of the European Chemoreception Research Organization, ECRO 2017, Cambridge, UK; *Chemical Senses*, Volume 43, Issue 3, March 2018, Pages 205–209, <https://doi.org/10.1093/chemse/bjx078>

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, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. 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.“

Gießen/

Ort/Datum

Unterschrift