

# Pathogenerkennung durch solitäre chemosensorische Zellen und Koppelung an die mukoziliäre Clearance

*Pathogen recognition by solitary chemosensory cells and coupling to mucociliary clearance*

## INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades in den Naturwissenschaften

**Dr. rer. nat.**

Am Fachbereich 08 – Biologie und Chemie, der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

**Alexander Perniß**, Biologe (M.Sc.) geboren in Suhl



Erstgutachterin: **Prof. Dr. em. Tina Trenczek**

Institut für Allgemeine Zoologie und Entwicklungsbiologie (FB 08)  
Justus-Liebig-Universität Gießen

Zweitgutachter: **Prof. Dr. Wolfgang Kummer**

Institut für Anatomie und Zellbiologie (FB 11)  
Justus-Liebig-Universität Gießen

Gießen 2022

## I. Abkürzungsverzeichnis

<b>%</b>	Prozent
<b>2-PT</b>	2-Propyl thietane
<b>4-DAMP</b>	1,1-dimethyl-4-diphenylacetoxypiperidinium iodide
<b>5-HT</b>	5-Hydroxytryptamin, Serotonin
<b>5-PTU</b>	5-Propyl-2-thiouracil
<b>6-PTU</b>	6-Propyl-2-thiouracil
<b>°C</b>	Grad Celsius
<b>[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub></b>	Intrazelluläre Calciumionenkonzentration
<b>μ</b>	Mikro
<b>μm</b>	Mikrometer
<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>ACh</b>	Acetylcholin
<b>AITC</b>	Allylisothiocyanat
<b>Alox5</b>	5-lipoxygenase
<b>AS</b>	Aminosäure
<b>ASL</b>	Airway surface liquid
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>Avil</b>	Advillin
<b>bp</b>	Basenpaare
<b>bzw.</b>	beziehungsweise
<b>c</b>	Zenti
<b>ca.</b>	Circa
<b>CALHM1</b>	Calcium homeostasis modulator 1
<b>CBF</b>	<i>Ciliary beat frequency</i>
<b>cAMP</b>	<i>Cyclisches Adenosinmonophosphat</i>
<b>cGMP</b>	<i>Cyclisches Guanosinmonophosphat</i>
<b>CD</b>	<i>Cluster of differentiation</i>
<b>cDNA</b>	<i>Complementary DNA</i>
<b>CFTR</b>	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator</i>
<b>CFU</b>	<i>Colony forming unit</i>
<b>CGRP</b>	<i>Calcitonin gene related peptide</i>
<b>ChAT</b>	<i>Cholin Acetyltransferase</i>
<b>CHT1</b>	<i>High affinity choline transporter 1</i>

<b>ChR2</b>	<i>Channelrhodopsin-2</i>
<b>CHX</b>	<i>Cycloheximid</i>
<b>CLSM</b>	<i>Confocal laser scanning microscope</i>
<b>CO<sub>2</sub></b>	<i>Kohlenstoffdioxid</i>
<b>Ct</b>	<i>Schwellenwert-Zyklus</i>
<b>CysLT</b>	<i>Peptido-(Cysteinyl-)Leukotriene</i>
<b>C-Terminus</b>	<i>Carboxy-Terminus</i>
<b>d</b>	<i>Tage</i>
<b>d.h.</b>	<i>das heißt</i>
<b>Da</b>	<i>Dalton</i>
<b>DAG</b>	<i>Diacylglycerin</i>
<b>DAMPs</b>	<i>Damage-associated molecular patterns</i>
<b>DAPI</b>	<i>4',6-Diamidino-2-phenylindol</i>
<b>DCLK1</b>	<i>Doublecortinlike kinase 1</i>
<b>DMSO</b>	<i>Dimethylsulfoxid</i>
<b>DNA</b>	<i>Desoxyribonukleinsäure</i>
<b>dNTP</b>	<i>Desoxyribonukleotidtriphosphat</i>
<b>DP</b>	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
<b>DRG</b>	<i>Dorsalwurzelganglien</i>
<b>DTA</b>	<i>Diphtheria toxin A</i>
<b>DTT</b>	<i>Dithiothreitol</i>
<b>EDTA</b>	<i>Ethylendiamintetraessigsäure</i>
<b>eGFP</b>	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
<b>ENaC</b>	<i>Epithelialer Natriumkanal</i>
<b>ER</b>	<i>endoplasmatischen Retikulum</i>
<b>et al.</b>	<i>et alteri</i>
<b>FACS</b>	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
<b>FCS</b>	<i>Fetales Kälberserum</i>
<b>FELASA</b>	<i>Federation of European Laboratory Animal Science Association</i>
<b>FFA</b>	<i>Free fatty acid</i>
<b>FLAP</b>	<i>Arachidonat-5-Lipoxygenase-aktivierendes Protein</i>
<b>FPR</b>	<i>Formyl Peptid Rezeptor</i>
<b>FPRL</b>	<i>Formyl Peptid like Rezeptor</i>
<b>FSC</b>	<i>Forward scatter</i>
<b>g</b>	<i>Gramm</i>

<b>GABA</b>	<i>Gamma-Aminobuttersäure</i>
<b>gDNA</b>	<i>Genomic DNA</i>
<b>GDP</b>	<i>Guanosindiphosphat</i>
<b>GTP</b>	<i>Guanosintriphosphat</i>
<b>GFP</b>	<i>Green fluorescent protein</i>
<b>GNAT3</b>	<i>Guanine nucleotide-binding protein G(t) subunit alpha-3</i>
<b>GPCR</b>	<i>G-Protein-gekoppelten Rezeptoren</i>
<b>h</b>	<i>Stunde</i>
<b>Hepes</b>	<i>2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure</i>
<b>HMGB1</b>	<i>High-mobility group protein 1</i>
<b>HPLC</b>	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
<b>Hz</b>	<i>Hertz</i>
<b>IAMs</b>	<i>intraepithelial airway macrophages</i>
<b>ILC2</b>	<i>innate lymphoid cells type 2</i>
<b>IL</b>	<i>Interleukin</i>
<b>IP<sub>3</sub></b>	<i>Inositoltriphosphat</i>
<b>IP3R3</b>	<i>IP3-Rezeptoren Typ 3</i>
<b>IRAK</b>	<i>IL-1R-associated protein kinase</i>
<b>JLU</b>	<i>Justus-Liebig-Universität</i>
<b>JNC</b>	<i>Jugular-Nodose-Komplex</i>
<b>k</b>	<i>Kilo</i>
<b>KCl</b>	<i>Kaliumchlorid</i>
<b>l</b>	<i>Liter</i>
<b>LED</b>	<i>Leuchtdiode</i>
<b>Log</b>	<i>Logarithmus</i>
<b>LT</b>	<i>Leukotrien</i>
<b>LTC<sub>4</sub>S</b>	<i>LTC<sub>4</sub>-Synthase</i>
<b>LPS</b>	<i>Lipopolysaccharide</i>
<b>L-NAME</b>	<i>NG-nitro-L-Argininmethylester</i>
<b>M</b>	<i>Molar</i>
<b>m</b>	<i>Meter/Mili</i>
<b>MALDI-TOF-MS</b>	<i>Matrix-Assistierte Laser-Desorption-Ionisierung (MALDI) mit der Flugzeitanalyse (time of flight, TOF)</i>
<b>M3R</b>	<i>Muskarinischer Acetylcholinrezeptor M3</i>
<b>MC</b>	<i>Mukoziliäre clearance</i>
<b>mCherry</b>	<i>monomeric red fluorescent protein</i>
<b>Mec</b>	<i>Mecamylamin</i>

<b>MEM</b>	<i>Minimum essential medium</i>
<b>min</b>	<i>Minute</i>
<b>mGluR</b>	<i>Metabotrope Glutamatrezeptoren</i>
<b>mOCT</b>	<i>optischen Kohärenztomographie</i>
<b>MOE</b>	<i>Main olfactory epithelium</i>
<b>mRNA</b>	<i>messenger RNA</i>
<b>Muc</b>	<i>Mucin (Maus)</i>
<b>MUC</b>	<i>Mucin (Mensch)</i>
<b>MW</b>	<i>Mittelwert</i>
<b>MyD88</b>	<i>Myeloid differentiation primary response protein 88</i>
<b>n</b>	<i>Nano</i>
<b>nAChR</b>	<i>Nikotinischer Acetylcholin Rezeptor</i>
<b>NaCl</b>	<i>Natriumchlorid</i>
<b>NB</b>	<i>Nippostrongylus brasiliensis</i>
<b>NCBI</b>	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
<b>NEB</b>	<i>Neuroepithelial bodies</i>
<b>NK-Zellen</b>	<i>Natürliche Killerzellen</i>
<b>NO</b>	<i>Stickstoffmonoxid</i>
<b>NOS</b>	<i>Stickstoffmonoxid-Synthase</i>
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	<i>nuclear factor kappa-B</i>
<b>NTS</b>	<i>Nucleus tractus solitarii</i>
<b>OD</b>	<i>Optische Dichte</i>
<b>OTOP1</b>	<i>Otopetrin 1</i>
<b>p</b>	<i>Piko</i>
<b>PAMPs</b>	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
<b>PBS</b>	<i>phosphate buffered saline</i>
<b>PCD</b>	<i>Primäre Ziliäre Dyskinesie</i>
<b>PCL</b>	<i>periciliary liquid layer</i>
<b>PCR</b>	<i>polymerase chain reaction</i>
<b>PFA</b>	<i>Paraformaldehyd</i>
<b>PGP9.5</b>	<i>protein gene product 9.5</i>
<b>pH</b>	<i>pondus hydrogenii</i>
<b>PIP<sub>2</sub></b>	<i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat</i>
<b>PKD2L1</b>	<i>Polycystic kidney disease 2-like 1</i>
<b>PLC</b>	<i>Phospholipase C</i>
<b>PLC<math>\beta</math>2</b>	<i>Phospholipase C beta 2</i>
<b>PNEC</b>	<i>pulmonary neuroendocrine cell</i>

<b>Pou2f3</b>	<i>POU Class 2 Homeobox 3</i>
<b>PRR</b>	<i>Pattern recognition receptors</i>
<b>PTC</b>	<i>Phenylthiocarbamid</i>
<b>PTS</b>	<i>Particle transport speed</i>
<b>p-Wert</b>	<i>probability value, Signifikanzwert</i>
<b>QSM</b>	<i>Quorum-sensing-Moleküle</i>
<b>q-PCR</b>	<i>quantitative polymerase chain reaction</i>
<b>RFP</b>	<i>Rot fluoreszierendes Protein</i>
<b>RNA</b>	<i>Ribonukleinsäure</i>
<b>ROI</b>	<i>Regions of interest</i>
<b>ROS</b>	<i>reactive oxygen species</i>
<b>rpm</b>	<i>Rounds per minute</i>
<b>RT</b>	<i>Reverse Transkription/Transkriptase</i>
<b>s</b>	<i>Sekunde</i>
<b>SCC</b>	<i>Solitäre chemosensorische Zelle</i>
<b>SCCC</b>	<i>Solitäre cholinerge chemosensorische Zelle</i>
<b>Scgb1a1</b>	<i>Secretoglobin Family 1A Member 1</i>
<b>SD</b>	<i>Standardabweichung</i>
<b>SEM</b>	<i>Standardfehler (Standard error of the mean)</i>
<b>SERCA</b>	<i>sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium-transporting-ATPase</i>
<b>SGLT1</b>	<i>Sodium-glucose cotransporter 1</i>
<b>SLPI</b>	<i>Secretory leukoprotease inhibitor</i>
<b>SP</b>	<i>Substanz P</i>
<b>SPF</b>	<i>Specific pathogen free</i>
<b>SSC</b>	<i>Side scatter</i>
<b>SucnR1</b>	<i>Succinatrezeptor 1</i>
<b><i>S. pneumoniae</i></b>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<b>TACR1</b>	<i>Tachykininrezeptor 1</i>
<b>TASR</b>	<i>Geschmacksrezeptor</i>
<b>TAS2R</b>	<i>Bitterrezeptoren</i>
<b>TIR</b>	<i>Toll-Interleukin 1 receptor</i>
<b>TLR</b>	<i>Toll-Like Rezeptor</i>
<b>Tab.</b>	<i>Tabelle</i>
<b>TIRAP</b>	<i>Toll/interleukin-1 receptor domain-containing adapter protein</i>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<i>tumor necrosis factor-<math>\alpha</math></i>

<b>TRAF-6</b>	<i>TNF receptor-associated factor 6</i>
<b>TRAM</b>	<i>TRIF-related adaptor molecule</i>
<b>TRIF</b>	<i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-<math>\beta</math></i>
<b>TRPM5</b>	<i>Transient receptor potential cation channel subfamily M member 5</i>
<b>TRPV1</b>	<i>Transient Receptor Potential Vanilloid 1</i>
<b>TTX</b>	<i>Tetrodotoxin</i>
<b>UTP</b>	<i>Uridintriphosphat</i>
<b>USA</b>	<i>United States of America</i>
<b>VACht</b>	<i>Vesikulärer Acetylcholintransporter</i>
<b>VNO</b>	<i>Vomeronasalorgan</i>
<b>WT</b>	<i>Wildtyp</i>
<b>X-Gal</b>	<i>5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-<math>\beta</math>-D-galactopyranosid</i>
<b>YFP</b>	<i>Yellow fluorescent protein</i>
<b>z.B.</b>	<i>zum Beispiel</i>

## II. Inhaltsverzeichnis

I. Abkürzungsverzeichnis .....	I
II. Inhaltsverzeichnis .....	VII
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Das Trachealepithel der Maus</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1.1 Zelltypen des Trachealepithels der Maus</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1.2 Funktionen des Trachealepithels</b> .....	<b>4</b>
<b>1.2 Mukoziliäre Clearance</b> .....	<b>5</b>
<b>1.2.1 Die Komponenten der MC</b> .....	<b>7</b>
1.2.1.1 Die ASL und ihre Zusammensetzung .....	7
1.2.1.2 Die Zilien und der Zilienschlag .....	8
1.2.1.2.1 Aufbau der Zilien .....	8
1.2.1.2.2 Der Zilienschlag .....	10
1.2.1.2.3 Beeinflussung des Zilienschlages .....	11
<b>1.3. Pathogenerkennung in den Atemwegen</b> .....	<b>12</b>
<b>1.3.1 Toll-Like Rezeptoren (TLR)</b> .....	<b>12</b>
<b>1.3.2 Formylpeptid-Rezeptoren (FPR)</b> .....	<b>15</b>
1.3.2.1 Humane und murine FPR .....	15
1.3.2.2 Expression der FPR .....	15
1.3.2.3 FPR-Liganden .....	17
1.3.2.4 FPR-Signalweg und Funktionen .....	18
<b>1.3.3 Geschmacksrezeptoren</b> .....	<b>19</b>
1.3.3.1 Geschmackstransduktionskaskade .....	24
1.3.3.2 Extraorale Bitterrezeptorexpression .....	25
<b>1.4 Solitäre Chemosensorische Epithelzellen</b> .....	<b>27</b>
<b>1.4.1 Lokalisation von SCC</b> .....	<b>27</b>
<b>1.4.2 Molekulare Charakteristika von SCC</b> .....	<b>29</b>
<b>1.4.3 Acetylcholin in SCC</b> .....	<b>30</b>
<b>1.4.4 Funktion der SCC</b> .....	<b>31</b>
1.4.4.1 Darm .....	32
1.4.4.2 Nase .....	36
.....	39

1.4.4.3 Trachea .....	40
<b>1.5 Zielsetzung dieser Arbeit</b> .....	<b>43</b>
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>45</b>
<b>2.1. Materialien und Geräte</b> .....	<b>45</b>
<b>2.1.1 Chemikalien, Medien und Reagenzien</b> .....	<b>45</b>
<b>2.1.2 Pharmaka</b> .....	<b>49</b>
<b>2.1.3 Peptide</b> .....	<b>51</b>
<b>2.1.4 Geräte</b> .....	<b>53</b>
<b>2.1.5 Computerprogramme</b> .....	<b>55</b>
<b>2.1.6 Antikörper</b> .....	<b>56</b>
2.1.6.1 Primärantikörper .....	56
2.1.6.2 Sekundärantikörper .....	57
2.1.6.3 Antikörper für FACS-Experimente .....	57
<b>2.1.7 Primer</b> .....	<b>57</b>
<b>2.1.8 Puffer und Lösungen</b> .....	<b>59</b>
<b>2.1.9 Versuchstiere</b> .....	<b>62</b>
<b>2.2 Methoden</b> .....	<b>66</b>
<b>2.2.1 Tötung der Versuchstiere und Gewebepräparation</b> .....	<b>66</b>
2.2.1.1 Präparation der Trachea .....	66
2.2.1.1.1 Präparation des Trachealepithels für die RNA-Extraktion .....	66
2.2.1.2 Präparation der Geschmacksknospen .....	67
2.2.1.3 Präparation des Vomeronasalorgans .....	67
2.2.1.4 Präparation des Ganglion jugulare- und Ganglion nodosum-Komplexes .....	68
<b>2.2.2 Immunhistochemische Färbungen</b> .....	<b>68</b>
2.2.2.1 Immunhistochemische Färbungen an Gewebeschnitten .....	68
2.2.2.2 Immunhistochemische Färbungen an Whole-Mount-Präparaten .....	69
2.2.2.3 Quantitative Auswertung der Immunhistochemie .....	70
2.2.2.3.1 an Gewebeschnitten .....	70
2.2.2.3.2 an Whole-Mount-Präparaten .....	71
<b>2.2.3. Histochemische Färbung – <math>\beta</math>-Galactosidase</b> .....	<b>71</b>
<b>2.2.4 Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS)</b> .....	<b>72</b>
<b>2.2.5 PCR-Untersuchungen</b> .....	<b>74</b>

2.2.5.1 Genotypisierungen .....	74
2.2.5.1.1 DNA-Extraktion.....	74
2.2.5.1.2 PCR.....	75
2.2.5.1.3 Gelektrophorese.....	76
2.2.5.2 RT-PCR von Gewebe, Blut und isolierten trachealen Epithelzellen.....	76
2.2.5.2.1 RNA-Isolation.....	76
2.2.5.2.1.1 RNA-Isolation aus Gewebe.....	76
2.2.5.2.1.2 RNA-Isolation aus Blut.....	77
2.2.5.2.1.3 RNA-Isolation aus isolierten trachealen Epithelzellen .....	77
2.2.5.2.2 cDNA-Synthese .....	78
2.2.5.2.2.1 cDNA-Synthese aus Gewebe und Blut .....	78
2.2.5.2.2.2 cDNA-Synthese aus isolierten trachealen Epithelzellen.....	79
2.2.5.2.3 PCR.....	80
<b>2.2.6 Partikeltransportmessungen .....</b>	<b>81</b>
2.2.6.1 Vorbereitung.....	81
2.2.6.2 Durchführung .....	82
2.2.6.3 Auswertung.....	83
<b>2.2.7 CBF-Messungen .....</b>	<b>84</b>
<b>2.2.8 Kontraktionsmessungen der Harnblase.....</b>	<b>85</b>
<b>2.2.9 Stimulation der Trachea für ACh-Konzentrationsmessungen .....</b>	<b>85</b>
2.2.9.1 Stimulation mit f-MKKFRW .....	86
2.2.9.2 Stimulation durch LED.....	86
<b>2.2.10 ACh-Konzentrationsmessungen mittels HPLC .....</b>	<b>87</b>
<b>2.2.11 Messungen der <math>[Ca^{2+}]_i</math> in Neuronen des JNC und M3-Reporterzellen.....</b>	<b>87</b>
2.2.11.1 Beschichtung von Deckgläschen mit Laminin und Poly-L-Lysin.....	87
2.2.11.2 Isolation von Neuronen des JNC .....	88
2.2.11.3 Vorbereitung der M3-Reporterzellen.....	90
2.2.11.4 Messung der $[Ca^{2+}]_i$ in Neuronen des JNC .....	90
2.2.11.5 Messung der $[Ca^{2+}]_i$ in M3-Reporterzellen .....	91
<b>2.2.12 Nachweis und Kultivierung von <i>B. pseudohinzii</i>.....</b>	<b>93</b>
<b>2.2.13 Infektionsexperimente mit <i>S. pneumoniae</i>.....</b>	<b>94</b>
2.2.13.1 Infektion der Versuchstiere .....	94

2.2.13.2 Tötung der Versuchstiere und Probenentnahme .....	95
2.2.13.3 Bestimmung der CFU im Blut.....	96
2.2.13.4 Histopathologische Untersuchungen .....	96
<b>2.2.14 Bioinformatische Analyse.....</b>	<b>97</b>
<b>2.2.15 Datenanalyse und statistische Auswertung .....</b>	<b>97</b>
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>98</b>
<b>3.1 Chemosensorische Epithelzellen in der Trachea der Maus .....</b>	<b>98</b>
<b>3.1.1 Abgrenzung solitärer neuroendokriner Zellen von SCCC und Lokalisation im Trachealepithel.....</b>	<b>98</b>
<b>3.2 Charakterisierungen der eingesetzten Mauslinien .....</b>	<b>102</b>
<b>3.2.1 Reportermauslinien.....</b>	<b>102</b>
3.2.1.1 <i>ChAT</i> -eGFP.....	102
3.2.1.2 <i>Trpm5</i> -GFP.....	104
3.2.1.3 <i>Tas2r143</i> -mCherry .....	105
3.2.1.4 <i>ChAT-ChR2</i> -YFP.....	108
<b>3.2.2 Gendefiziente Mausstämme .....</b>	<b>111</b>
3.2.2.1 <i>Trpm5</i> -Ko.....	112
3.2.2.2 <i>Pou2f3</i> -Ko.....	114
3.2.2.3 <i>M3R</i> -Ko.....	118
3.2.2.4 <i>Tas2r43</i> -Ko.....	119
<b>3.2.3 Zellablationsmodell <i>Trpm5</i>-DTA .....</b>	<b>120</b>
<b>3.3 Entwicklung der SCCC in der Trachea der Maus .....</b>	<b>122</b>
<b>3.3.1 Anzahl der SCCC in Tracheen von <i>ChAT</i>-eGFP-Mäusen in Abhängigkeit vom Alter der Versuchstiere .....</b>	<b>122</b>
3.3.1.1 Co-Expression von ChAT-eGFP und TRPM5 in Abhängigkeit vom Alter der Versuchstiere.....	123
<b>3.3.2 SCCC in Abhängigkeit von der Mikrobiota des Versuchstieres .....</b>	<b>127</b>
3.3.2.1 Anzahl der SCCC in gnotobiotischen Mäusen.....	127
3.3.2.2 Anzahl der SCCC in <i>Myd88</i> -, <i>Tlr2</i> -, <i>Tlr4</i> - und <i>Tlr2/4</i> -defizienten Mäusen.....	129
<b>3.4 Einfluss bakterieller Peptide auf den zilienabhängigen Partikeltransport .....</b>	<b>130</b>
<b>3.4.1 Einfluss von bakteriellen Signalpeptiden auf die MC .....</b>	<b>130</b>

3.4.1.1 Beteiligung von FPR an der Erhöhung der PTS durch bakterielle Signalpeptide .....	136
3.4.1.2 Beteiligung von SCCC und der Geschmackstransduktionskaskade an der Erhöhung der PTS durch bakterielle Signalpeptide .....	142
<b>3.5 Einfluss von Geschmacksrezeptoren und ihren Liganden auf die PTS.....</b>	<b>146</b>
<b>3.5.1 Beeinflussung der PTS in Abhängigkeit von Tas1r-Geschmacksrezeptoren .....</b>	<b>146</b>
<b>3.5.2 Beeinflussung der PTS in Abhängigkeit von Tas2r .....</b>	<b>147</b>
3.5.2.1 Tas2r-Agonisten .....	148
3.5.2.2 Beeinflussung der PTS durch f-MKKFRW in Abhängigkeit von den Bitterrezeptoren Tas2r143/135/126.....	153
<b>3.6 Freisetzung von ACh durch tracheale SCCC .....</b>	<b>156</b>
<b>3.6.1 ACh-Freisetzung durch SCCC nach Stimulation mit f-MKKFRW .....</b>	<b>156</b>
3.6.1.1 HPLC .....	156
3.6.1.2 M3R-Reporterzellen .....	157
<b>3.6.2 ACh-Freisetzung nach optogenetischer Stimulation durch SCCC .....</b>	<b>164</b>
<b>3.6.3 Zelltypspezifische Deletion der ChAT in SCCC.....</b>	<b>168</b>
<b>3.6.4 Cholinerge Signalübermittlung von SCCC zu zilientragenden Zellen nach Stimulation durch formylierte Peptide.....</b>	<b>169</b>
3.6.4.1 Rolle muskarinischer ACh-Rezeptoren.....	169
<b>3.7 Abhängigkeit der Erhöhung der PTS durch f-MKKFRW von NO .....</b>	<b>172</b>
<b>3.8 Beteiligung sensorischer Nervenfasern an der Erhöhung der PTS durch f-MMKFRW .....</b>	<b>173</b>
<b>3.9 Relevanz der SCCC für die bakterielle Besiedlung der Trachea und Lunge .....</b>	<b>176</b>
<b>3.9.1 Einfluss von bakteriellen Überständen von MgrB-überexprimierenden <i>E. coli</i> auf die PTS .....</b>	<b>176</b>
<b>3.9.2 Relevanz des Ionenkanals TRPM5 für die Besiedlung des respiratorischen Systems durch <i>Bordetella pseudohinzii</i> .....</b>	<b>179</b>
<b>3.9.3 Relevanz von SCCC für die Besiedlung des respiratorischen Systems durch <i>S. pn</i>.....</b>	<b>181</b>
3.9.3.1 Histologische Veränderungen in der Trachea und Lunge nach Infektion mit <i>S. pneumoniae</i> .....	183
3.9.3.2 Antikörpermarkierungen mit Antikörpern gegen <i>S. pneumoniae</i> in der Lunge .....	186
3.9.3.3 Anzahl an SCCC im Trachealepithel nach Infektion mit <i>S. pneumoniae</i> .....	187

<b>4. Diskussion</b> .....	189
<b>4.1 Wann entstehen tracheale SCC und ist die Entstehung abhängig vom Vorhandensein eines lebenden Mikrobioms?</b> .....	189
<b>4.2 Gibt es neben den bekannten Aktivatoren der Mukoziliären Clearance auch andere bakterielle Stoffe, welche diese beeinflussen?</b> .....	195
<b>4.2.1 f-MKKFRW steigert die PTS unabhängig von FPR</b> .....	197
<b>4.3 Sind SCC an der Erkennung dieser neu identifizierten Stoffe beteiligt?</b> .....	198
<b>4.3.1 Sind Komponenten der Geschmackstransduktionskaskade an der Erkennung von f-MKKFRW durch SCCC beteiligt?</b> .....	200
<b>4.4 Sind SCCC in der Lage ACh aktiv zu sezernieren, und wird durch die neu identifizierten Liganden ACh aus SCCC freigesetzt, welches den Zilienschlag beeinflusst?</b> .....	201
<b>4.4.1 Signalübertragung von SCCC auf zilientragende Zellen: Rolle sensorischer Nervenfasern</b> .....	204
<b>4.4.2 Signalübertragung von SCCC auf zilientragende Zellen: Rolle muskarinischer ACh-Rezeptoren</b> .....	210
<b>4.5 Führt die Applikation von TasR-Liganden ebenfalls zu einer Stimulation und anschließender ACh-Sekretion aus SCCC?</b> .....	211
<b>4.6 Beteiligung von Tas2R an der durch f-MKKFRW-induzierten Erhöhung der PTS</b> .....	216
<b>4.7 Haben die Unterbrechung der Geschmackstransduktionskaskade oder das Fehlen der trachealen SCCC einen Einfluss auf die bakterielle Besiedlung der Trachea und/oder der Lunge?</b> .....	219
<b>4.8 Fazit</b> .....	224
<b>5. Zusammenfassung</b> .....	225
<b>6. Summary</b> .....	227
<b>7. Publikationen und Auszeichnungen</b> .....	229
<b>7.1 Publikationen, welche direkt aus der Promotionsarbeit hervorgegangen sind</b> ..	229
<b>7.2 Publikationen, welche innerhalb des Promotionszeitraums veröffentlicht wurden</b> .....	229
<b>7.3 Auszeichnungen</b> .....	231
<b>8. Abbildungsverzeichnis</b> .....	232
<b>9. Tabellenverzeichnis</b> .....	236
<b>10. Literaturverzeichnis</b> .....	237
<b>11. Appendix</b> .....	273
<b>12. Danksagung</b> .....	337
<b>13. Erklärung</b> .....	339

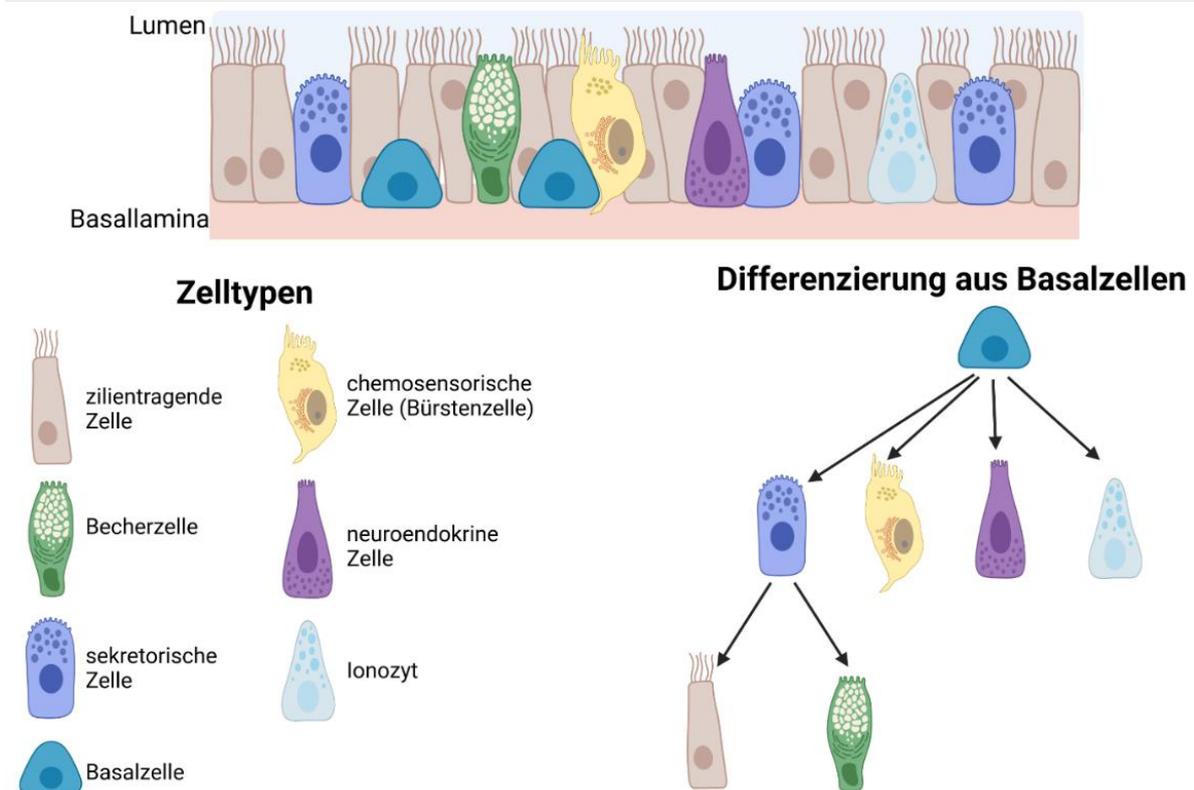
# 1. Einleitung

## 1.1 Das Trachealepithel der Maus

### 1.1.1 Zelltypen des Trachealepithels der Maus

Das Trachealepithel besteht aus polarisierten Zellen, welche einer Basallamina aufgelagert sind, jedoch erreichen nicht alle Zellen das Lumen. Die Epithelzellen bilden in der Trachea ein mehrreihiges hochprismatisches Epithel aus (Crystal 1997). Es können im Trachealepithel der Maus mindestens 6 Zelltypen anhand ihrer Morphologie und Ultrastruktur voneinander abgegrenzt werden (Pack et al. 1980). Dies sind: 1. sekretorische Zellen (50-60%), 2. zilienträgende Zellen (36-55%), 3. Basalzellen (5-10%), 4. Becherzellen (<1%), 5. chemosensorische Zellen (Bürstenzellen) (<1%), 6. neuroendokrine Zellen (<1%) (Abb.1) (Pack et al. 1980; Klein et al. 2009). In neueren Untersuchungen, in denen Einzelzell-RNA-Sequenzierungen des Trachealepithels durchgeführt wurden, konnte ein weiterer Zelltyp identifiziert werden, sogenannte Ionozyten (Montoro et al. 2018; Plasschaert et al. 2018). Zudem wurden die Basalzellen anhand ihrer unterschiedlichen Genexpressionsmuster in drei weitere Zelltypen unterteilt: proliferierende Basalzellen, Krt4/13-positive Basalzellen (*hillock-cell*) und Basalzellen (Plasschaert et al. 2018; Montoro et al. 2018). Neben den Epithelzellen sind jedoch auch residente Immunzellen im Trachealepithel präsent; ein Beispiel dafür stellt eine spezifische Population an Makrophagen dar (*intraepithelial airway macrophages* (IAMs)), welche sich von den residenten Makrophagen in der Alveolarregion der Lunge unterscheiden (Engler et al. 2020).

1. Sekretorische Zelle: Der apikale Teil dieser Zelle ist mit kurzen Mikrovilli besetzt und enthält eine hohe Anzahl an Vesikeln, zudem wölbt sich dieser in das Lumen hervor (Pack et al. 1980). Anhand ihrer Form und Charakteristika weist sie Ähnlichkeiten mit den in den unteren Atemwegen vorkommenden Club-Zellen (Keulenzellen) auf und wird daher auch als Club-Zell ähnlich (*Club-like cell*) bezeichnet (Pack et al. 1980). Die hohe Anzahl an Vesikeln spricht für eine sekretorische Funktion dieses Zelltyps (Pack et al. 1980; Hansell und Moretti 1969). Sezernierte Proteine sind z.B. Uteroglobulin (Scgb1a1) und die Muzine MUC5B und MUC5A. So konnte von Plasschaert und KollegInnen eine erhöhte Expression dieser Gene in sekretorischen Zellen beobachtet werden. Zudem wurde die Präsenz dieser Proteine mittels Immunmarkierungen verifiziert (Plasschaert et al. 2018).



**Abbildung 1: Schematische Darstellung der Zelltypen des Trachealepithels der Maus.** Alle Epithelzellen liegen der Basallamina auf. Basalzellen sind die Vorläuferzellen aller Epithelzellen, jedoch entstehen zilientragende sowie Becherzellen aus sekretorischen Zellen, welche wiederum aus Basalzellen entstehen.

2. Zilientragende Zelle: Charakteristisch für diesen Zelltyp ist das Vorhandensein der Zilien. Diese weisen eine Länge von ca. 6  $\mu\text{m}$  auf und jede Zelle trägt zwischen 100-200 Zilien. Zwischen den Zilien sind ca. 1,8  $\mu\text{m}$  lange Mikrovilli vorhanden, welche die Zelloberfläche vergrößern (Hansell und Moretti 1969; Wanner et al. 1996). Die Zilien schlagen kontinuierlich in einem bestimmten Muster. Dies führt zu einem stetigem Transport des auf dem Epithel befindlichen Flüssigkeitsfilms, in dem eingeatmete Partikel und Mikroorganismen gebunden sind. Dieser Mechanismus, welcher als Mukoziliäre Clearance (MC) bezeichnet wird, wird in Kapitel 1.2 detailliert erläutert. Zudem exprimieren zilientragende Zellen eine Vielzahl von Ionenkanälen und sind an der Sekretion und Absorption von Ionen beteiligt, was wiederum die Höhe des Flüssigkeitsfilms über dem Epithel beeinflusst (Hollenhorst et al. 2011).

3. Basalzellen: Diese Zellen sitzen großflächig der Basallamina auf und erreichen nicht das Lumen (Pack et al. 1980). Die Basalzellen stellen multipotente Vorläuferzellen dar, aus denen sich sekretorische Zellen, neuroendokrine Zellen, chemosensorische (Bürsten) Zellen und Ionozyten ausdifferenzieren. Die sekretorischen Zellen wiederum können sich weiter zu zilientragenden Zellen und Becherzellen differenzieren (Abb. 1) (Montoro et al. 2018; Hong et al. 2004).

4. Becherzellen: Dieser Zelltyp ist in der murinen Trachea sehr selten und entspricht nur 0,1-0,5 % aller Epithelzellen. Ihre Anzahl nimmt in Richtung der Bifurkation zu (Pack et al. 1980). Sie besitzen keine Mikrovilli und der apikale Teil der Zelle ragt leicht in das Lumen hervor. Becherzellen weisen eine hohe Anzahl von Vesikeln, Ribosomen und einen ausgeprägten Golgi-Apparat auf. Zudem erscheinen sie im Elektronenmikroskop sehr dunkel. Diese Eigenschaften sprechen für eine hohe sekretorische Aktivität (Pack et al. 1980). Einzelzell-RNA-Sequenzierungen zeigten, dass Becherzellen im hohen Maße mRNA für Muzine produzieren, darunter MUC5B und MUC5AC (Montoro et al. 2018). Zusammen mit den sekretorischen Zellen und den sublaryngealen Drüsen sind sie für die Mukusproduktion verantwortlich.

5. Chemosensorische Zellen (Bürstenzellen): Für diesen Zelltyp charakteristisch ist ein Saum aus Mikrovilli, welche den apikalen Teil der Zelle bedecken. Diese Mikrovilli unterscheiden sich von denen der übrigen Zelltypen. Sie erscheinen im Elektronenmikroskop etwas länger und strukturierter. Anhand dieser Mikrovilli wurde dieser Zelltyp als „Bürstenzelle“ (engl. *Brush* oder *Tuft cell*) beschrieben (Rhodin und Dalhamn 1956; Pack et al. 1980), jedoch ist diese Bezeichnung als problematisch anzusehen, da neuroendokrine Zellen ebenfalls einen Saum aus Mikrovilli mit einem ähnlichen Erscheinungsbild aufweisen (Ericson et al. 1972; Kummer et al. 2008). Aus diesem Grund werden diese Zellen in der vorliegenden Arbeit als solitäre (cholinerge) chemosensorische Zellen bezeichnet (SCC oder SCCC). SCC werden in dem Kapitel 1.4 detaillierter beschrieben.

6. Neuroendokrine Zellen (pulmonary neuroendocrine cells (PNEC)): Charakteristisch für diesen Zelltyp ist das Vorhandensein von elektronendichten Vesikeln (*dense core vesicles*), welche im basalen Teil der Zelle aggregieren (Ericson et al. 1972; Gould et al. 1978; Cutz und Conen 1972). Diese Vesikel enthalten unter anderem das Neuropeptid CGRP (*calcitonin gene-related peptide*). Die Zellen bilden zudem Neurotransmitter wie GABA (Gamma-Aminobuttersäure) und 5-HT (5-Hydroxytryptamin, Serotonin) (Cadieux et al. 1986; Ericson et al. 1972). Ein weiterer Marker für die Identifikation der PNEC stellt PGP9.5 (*protein gene product 9.5*) dar. Dieses Protein wird als allgemeiner Marker für neurale sowie neuroendokrine Zellen angesehen (Thompson et al. 1983). Über die physiologische oder pathophysiologische Funktion dieses Zelltyps ist wenig bekannt. Sui und KollegInnen konnten zeigen, dass Mäuse, denen neuroendokrine Zellen fehlen, verringerte Reaktionen in einem Asthmodell aufwiesen. Zudem konnte gezeigt werden, dass diese Zellen GABA freisetzen, welches wiederum zu einer Hyperplasie von Becherzellen führte, einem typischen Merkmal einer asthmatischen Erkrankung (Sui et al. 2018). In den intrapulmonalen Atemwegen kann dieser Zelltyp ebenfalls nachgewiesen werden, wobei dort die Zellen meist nicht einzeln vorliegen, sondern sich in Gruppen zu NEB (*neuroepithelial bodies*) zusammenlagern (Cutz et al. 2013).

Besondere Aufmerksamkeit erhielt dieser Zelltyp durch die Erkenntnis, dass ein Lungenkarzinomtyp, das sogenannte kleinzellige Lungenkarzinom (*small cell lung carcinoma*), aus diesem Zelltyp entsteht (Hattori et al. 1972; Park et al. 2011).

7. Ionozyten: Die Ionozyten wurden erstmals 2018 in zwei voneinander unabhängigen Publikationen beschrieben (Plasschaert et al. 2018; Montoro et al. 2018). Dieser Zelltyp konnte sowohl im Trachealepithel der Maus als auch des Menschen nachgewiesen werden (Plasschaert et al. 2018). Charakteristisch für diesen Zelltyp ist eine hohe Expression des Chlorid-Kanals CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*), sowie des Transkriptionsfaktors Foxi1 (Plasschaert et al. 2018; Montoro et al. 2018). Die Funktion dieses Zelltyps ist noch nicht geklärt. Die AutorInnen beider Publikationen implizieren den Ionozyten eine Schlüsselrolle in der Flüssigkeitshomöostase sowie der Mukus-Regulierung in den Atemwegen. Diese Vermutung wird aber von anderen Experten kritisch gesehen und die Funktionen dieses Zelltyps sind Gegenstand aktueller Forschungen (Hawkins und Kotton 2018).

### 1.1.2 Funktionen des Trachealepithels

Das Lungenepithel stellt die größte Epitheloberfläche des Körpers dar und ist über die inhalierte Atemluft direkt der Umwelt ausgesetzt (Toews 1993). Die Atemluft enthält dabei eine Vielzahl an potenziellen Gefahrstoffen für den Organismus, wie z.B. mikrobielle Erreger (Bakterien, Viren), Allergene (Pflanzenpollen), Toxine (Gase) und Schmutzpartikel (Tabakrauch) (Chilvers und O'Callaghan 2000). Die Tatsache, dass Infektionen des respiratorischen Systems jedoch eher selten vorkommen, legt nahe, dass sich eine Vielzahl von Abwehrmechanismen entwickelt haben, welche das Eindringen und die Vermehrung von Mikroorganismen verhindern. Diese Abwehrmechanismen sind Husten, die Ausbildung von physikalischen Barrieren, wie dem Epithel, Veränderungen im Luftdruck und verschiedene Immunmechanismen, jedoch stellt die MC den primären Abwehrmechanismus dar (Bustamante-Marin und Ostrowski 2017).

Die Epithelzellen sind durch Zellkontakte, wie der Zonula occludens (*tight junctions*), Zonula adherens und Desmosomen miteinander verbunden (Welsch et al. 2018). Dadurch entsteht eine mechanische Barriere, welche das Eindringen von Mikroorganismen, Partikeln und Noxen verhindert. Diese Zellkontakte sichern ebenso die Aufrechterhaltung der Polarität der Epithelzellen. Dies ist unerlässlich, um einen gerichteten Transport von Ionen über das Epithel zu gewährleisten. Einem dadurch entstehenden Ionengradienten folgt Wasser, entweder passiv zwischen den Epithelzellen hindurch, oder intrazellulär mittels spezialisierten Kanälen, sogenannten Aquaporinen (Hollenhorst et al. 2011). Dies bildet die Grundlage für die Entstehung und Regulation einer Flüssigkeitsschicht apikal des Epithels. Diese

Flüssigkeitsschicht einschließlich des darin schwimmenden Mukus wird durch den koordinierten Schlag der Zilien abtransportiert. Dieser Schlüsselmechanismus in der Abwehr von Infektionserregern und der Säuberung der Atemwege von inhalierten Partikeln wird als MC bezeichnet (Wanner et al. 1996; Bustamante-Marin und Ostrowski 2017). Dieser Mechanismus wird in Kapitel 1.2 genauer erläutert.

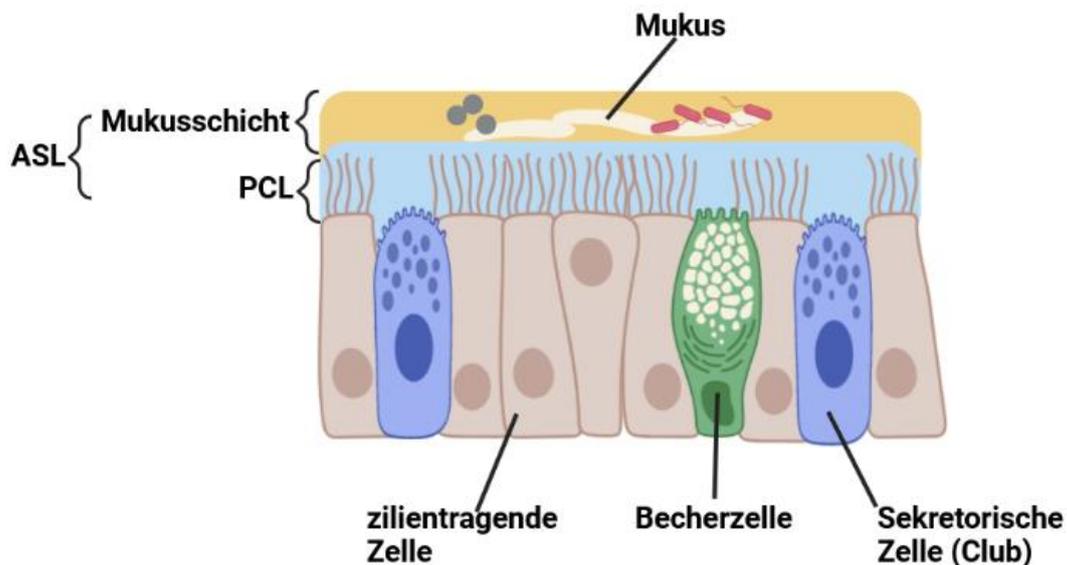
Atemwegsepithelzellen sezernieren aber auch aktiv Stoffe, welche eine antimikrobielle Wirkung aufweisen. Schon 1992 konnte Alexander Flemming in Experimenten zeigen, dass Sekrete aus den Atemwegen eine antimikrobielle Wirkung aufweisen. Diese Eigenschaft sprach er einem Stoff zu, den er als Lysozym bezeichnete (Flemming A. 1922). Heute weiß man, dass dieses antimikrobiell wirkende Enzym von neutrophilen Granulozyten, aber auch von Atemwegsepithelzellen gebildet wird (Duszyk 2001). Neben Lysozym werden noch weitere antimikrobiell wirkende Stoffe, wie Lactoferrin, *secretory leukoprotease inhibitor* (SLPI),  $\beta$ -Defensine und Cathelicidine (LL-37) von Epithelzellen produziert und freigesetzt (Ganz 2002; Hiemstra et al. 2015).

Diese verschiedenen Abwehrmechanismen greifen ineinander und verhindern die Besiedlung der Atemwege und der Lunge durch Pathogene.

### **1.2 Mukoziliäre Clearance**

Die MC stellt einen Komplex aus verschiedenen Teilaspekten dar, welche ineinander übergreifen und miteinander interagieren. Zum einen wird von den Epithelzellen eine Flüssigkeits- und Schleimschicht produziert, welche aus zwei Phasen besteht, einer periziliären wässrigen Phase (periciliary liquid layer = PCL), die direkt dem Epithel aufliegt, und einer darüber liegenden mukösen Phase, welche einen hohen Gehalt an Muzinen aufweist (Mukusschicht). Beide Schichten zusammen werden als ASL (*airway surface liquid*) bezeichnet (Abb. 2) (Rubin 2002; Bustamante-Marin und Ostrowski 2017). Diese Schleimschicht stellt eine physikalische Barriere dar, in der eingeatmete Partikel oder Mikroorganismen eingefangen werden, wodurch verhindert wird, dass diese sich in die distalen Atemwege weiterbewegen. Zudem sind in dieser Schleimschicht auch antimikrobiell wirkende Stoffe, wie Proteasen und spezielle Inhibitoren von bakteriellen Proteasen, Stickstoffmonoxid (NO), Lysozym und Wasserstoffperoxid enthalten (Ganesan et al. 2013; Zanin et al. 2016). Zum anderen werden die eingefangenen Partikel und Mikroorganismen zusammen mit der Mukusschicht durch den koordinierten Schlag der Zilien der zilientragenden Zellen in Richtung des Pharynx abtransportiert und entweder ausgehustet oder geschluckt (Wanner et al. 1996).

Die MC ist essentiell für die Prävention von Infektionen des respiratorischen Systems. Dies wird deutlich, wenn Störungen einzelner Komponenten der MC auftreten. So leiden Menschen, welche genetische Defekte aufweisen, die in einer veränderten Morphologie und Funktion der Zilien münden (Ziliopathien), an einem erhöhten Infektionsrisiko. Ein Beispiel dafür ist die Primäre Ziliäre Dyskinesie (PCD) (Wijers et al. 2017). Ein anderes Beispiel stellt die zystische Fibrose oder Mukoviszidose dar. Bei dieser Erkrankung liegen eine oder mehrere Mutationen in dem für den Chlorid-Kanal CFTR codierenden Gen vor (Boucher 2004). Unter anderem leiden die Betroffenen an immer wiederkehrenden Infektionen der Lunge und Atemwege. Der CFTR ist für die Sekretion von Chlorid-Ionen in die PCL zuständig. Liegt eine verringerte Aktivität des CFTR vor, erhöht sich die Viskosität der PCL, zudem nimmt ihre Höhe ab. Beides in Kombination führt zu einer verringerten MC und zu einem erhöhten Infektionsrisiko (Boucher 2004; Kurbatova et al. 2015).



**Abbildung 2: Schematischer Aufbau der Komponenten der Mukoziliären Clearance in der Trachea.** Becherzelle, sekretorische Zellen und zilientragende Zellen produzieren Bestandteile der PCL (PCL = *periciliary liquid layer*), einer wässrigen Schicht zwischen den Zilien. Auf dieser Schicht liegt eine visköse Schicht, die einen hohen Anteil an Mukus-Proteinen enthält. Beide Schichten zusammen werden als ASL (*airway surface liquid*) zusammengefasst. Die Mukusschicht wird durch den kontinuierlichen Zilienschlag in Richtung des Pharynx transportiert. Im Mukus werden eingeatmete Partikel und Mikroorganismen festgehalten und abtransportiert. Weitere Zelltypen des Trachealepithels sind explizit nicht dargestellt.

Die Relevanz der MC für die bakterielle Besiedlung der Atemwege wird ebenfalls dadurch deutlich, dass bestimmte Bakterienspezies Proteine entwickelt haben, um an Zilien binden zu können und im Anschluss den Zilienschlag zu reduzieren und so einer Entfernung aus den Atemwegen zu entgehen. Ein Beispiel dafür stellen die humanpathogene Bakterien *Bordetella pertussis* und *parapertussis* dar. Diese Bakterien produzieren eine Reihe von Proteinen, z.B.

*filamentous hemagglutinin A* und Pertactin, welche direkt an die Zilien binden und die Funktion dieser beeinflussen. Diese Bakterien sind Verursacher des Keuchhustens (Edwards et al. 2005). Aber auch bei anderen Tierarten, wie Vögeln (*Bordetella avium*), Hunden (*Bordetella bronchiseptica*) und Mäusen (*Bordetella pseudohinzii*) haben sich Spezies des Genus *Bordetella* auf die Anheftung an Zilien spezialisiert (Arp und Cheville 1984; Bemis et al. 1977; Perniss et al. 2018).

### 1.2.1 Die Komponenten der MC

#### 1.2.1.1 Die ASL und ihre Zusammensetzung

Die PCL, welche den Epithelzellen aufgelagert ist stellt eine leicht visköse Flüssigkeit dar, welche in ihrer Höhe in etwa der Länge der Zilien entspricht. In Zellkulturmodellen mit Trachealzellen der Maus konnte eine Höhe von ca. 6 µm beobachtet werden (Mall et al. 2010). Die Höhe der PCL ist primär abhängig von Ionentransportprozessen. So führt eine Veränderung der Expression des Epithelialen Natrium-Kanals (ENaC) zu einer Verringerung der PCL-Höhe (Mall et al. 2010). Dies kann ebenso bei humanen Atemwegsepithelzellen beobachtet werden, wenn eine verringerte CFTR-Funktionalität vorliegt (Tarran et al. 2006). Eine verringerte Höhe der PCL korreliert dabei mit einer verringerten MC (Mall et al. 2010). Die PCL besteht neben Wasser aus einer Vielzahl von Muzinen, wie MUC1, MUC4, MUC16 und MUC20 und anderen Molekülen wie Glycolipiden und Surfactant. Diese bilden zusammen ein schwammartiges Geflecht aus, welches sich mit den Zilien verbindet. Dieses Modell wird auch als „gel-on-brush“-Modell bezeichnet, wobei die Bürsten (Brush) die Zilien darstellen und die muzinhaltige PCL das „Gel“, (Randell und Boucher 2006; Zanin et al. 2016). Dieses Geflecht verhindert zum einen das Eindringen von Partikeln und Mikroorganismen durch die PCL, zum anderen verhindert es, dass der aufgelagerte Mukus sich mit der PCL vermischt. Die Höhe der ASL ist sehr variabel und kann abhängig von der Lokalisation wie auch Stimulation eine Höhe von 5-70 µm in den Atemwegen aufweisen (Atanasova und Reznikov 2019; Randell und Boucher 2006).

Die Mukusschicht besteht zu ~95-97% aus Wasser und nur 1-5% machen Muzine, Salze und andere Proteine aus. Die Muzine sind im Gegensatz zu denen in der PCL gelbildend; das bedeutet, dass diese sich zu 0,5-20 µm langen Mukuspuffen zusammenlagern. In diesen verfangen sich Partikel und Mikroorganismen und werden anschließend abtransportiert (Fahy und Dickey 2010; Rees et al. 1990; Randell und Boucher 2006). Die wichtigsten Muzine in der Mukusschicht der Atemwege sind MUC5AC und MUC5B, daneben sind aber auch MUC2, MUC6 und MUC19 zu finden (Portal et al. 2017; Valque et al. 2011). Besonders MUC5B scheint essentiell für die Abwehr von Mikroorganismen sowie für die Entwicklung der Lunge zu sein. Mäuse, welche eine Defizienz für MUC5B aufweisen, zeigen Veränderungen in der

Entwicklung der Atemwege und Lunge. So weisen diese Tiere eine Verdickung der Alveolarwände auf, Kollaps der Alveolaren, Ablagerungen von Kollagen- und Elastin-Fasern sowie einen massiven Influx von Immunzellen in das Gewebe. Diese Beobachtungen können bereits bei zwei Tage alten Tieren festgestellt werden. Dieser Phänotyp verstärkt sich jedoch im Alter zunehmend (Valque et al. 2019). Zudem konnte gezeigt werden, dass diese Mäuse eine höhere Mortalität aufweisen. So werden nur ~50% der Tiere älter als 12 Monate. Dies konnte auf eine hohe Rate an Atemwegsinfektionen der Mäuse zurückgeführt werden. Zudem wiesen MUC5B-defiziente Mäuse, welche experimentell mit *Staphylococcus aureus* infiziert wurden, eine erhöhte Mortalität auf. So verstarben 60% der gendefizienten Tiere innerhalb von 21 Tagen, dagegen 0% der Wildtyp-Mäuse (Riera et al. 2009; Roy et al. 2014). Diese Beobachtungen untermauern die Relevanz der MC und der Muzinschicht als wichtigen Abwehrmechanismus.

### 1.2.1.2 Die Zilien und der Zilienschlag

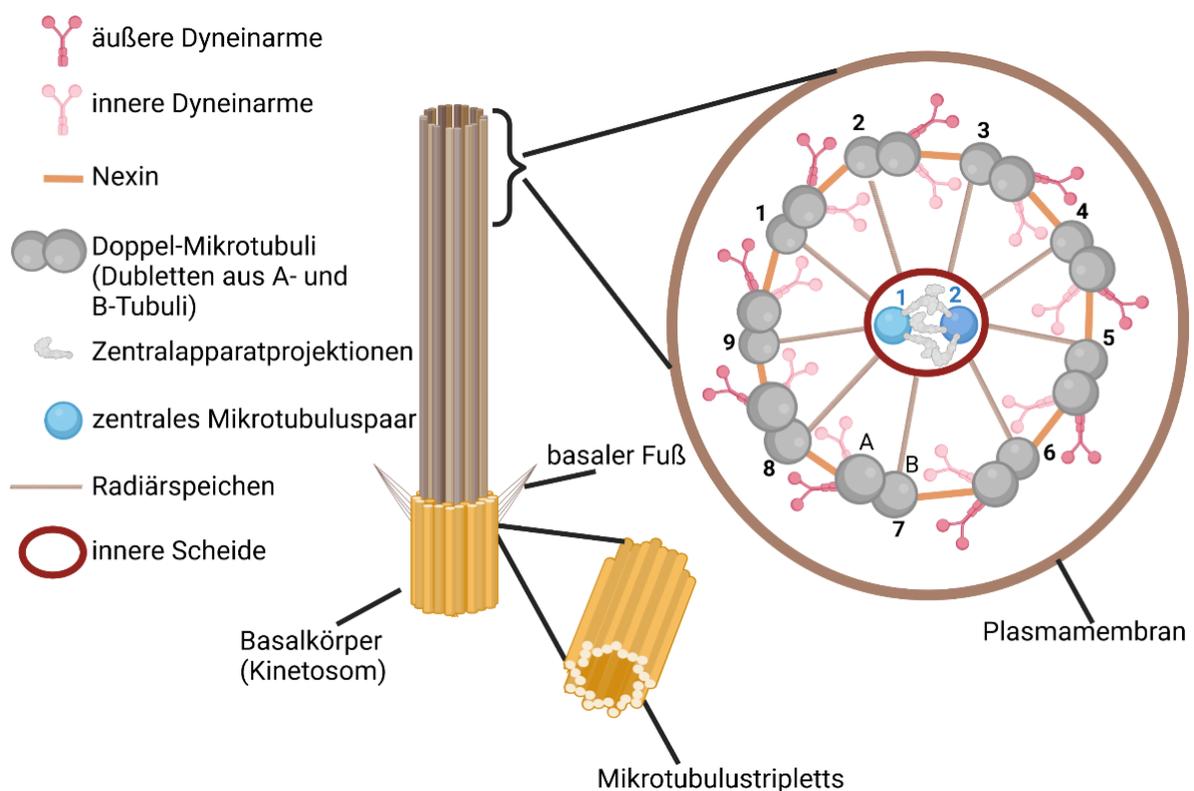
#### 1.2.1.2.1 Aufbau der Zilien

Generell kann man primäre und sekundäre Zilien voneinander abgrenzen. Diese unterscheiden sich in Aufbau und Funktion. Sekundäre Zilien sind motil; dies bedeutet, dass sie sich aktiv bewegen können. Dieser Zilientyp ist auf Epithelzellen der Atemwege, des Oviducts und der *Ductuli efferentes* zwischen Hoden und Nebenhoden zu finden, aber auch auf Ependymzellen im Gehirn (Wallmeier et al. 2020). Ihre generelle Funktion besteht in dem gerichteten Transport von Flüssigkeiten, wie dem Mukus in den Atemwegen oder dem Liquor in den Ventrikeln des Gehirns (Drenckhahn 2008).

Die Zilien stellen Membranausstülpungen mit einem organisierten Mikrotubulussystem dar. Jedes sekundäre Zilium beinhaltet neun Mikrotubulusdubletten, welche ringförmig um ein zentral liegendes Mikrotubuluspaar angeordnet sind (Abb. 3). Dieser Aufbau wird als 9+2 bezeichnet. Dagegen weisen primäre Zilien kein zentrales Tubuluspaar auf, ihr Aufbau wird als 9+0 bezeichnet (Satir et al. 2010). Das innere Mikrotubuluspaar wird von einer Hülle umgeben, welche als innere Scheide bezeichnet wird. Die neun Mikrotubulusdubletten bestehen jeweils aus einem A-Tubulus, welcher aus 13 Protofilamenten aufgebaut ist, und einem B-Tubulus, welcher aus 11 Protofilamenten aufgebaut ist. Die Dubletten sind untereinander durch Verbindungsproteine, sogenannte Nexine verbunden. Wiederum sind die Dubletten durch Radiärspeichen mit der inneren Scheide verbunden. Die Protofilamente bestehen hauptsächlich aus den Proteinen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin sowie Tektin, welches die A- und B-Tubuli teilweise miteinander verbindet (Wanner et al. 1996). Die Plasmamembran umgibt als äußere Hülle das Zilium (Drenckhahn 2008; Wanner et al. 1996). An der Spitze der Zilien sind bei einigen Spezies, wie dem Menschen oder der Ratte, klauenartige Fortsätze

beschrieben, deren mögliche Funktion in der Unterstützung des Mukustransportes liegt (Satir und Christensen 2008). Verankert sind die Zilien in der Zelle durch einen Basalkörper (Kinetosom) sowie dem Basalfuß (Drenckhahn 2008). Der Basalkörper besteht aus neun Mikrotubulstripletten und verankert das Zilium in dem Zytoskelett (Satir und Christensen 2008). Die gleiche Ausrichtung der Basalkörper aller Zilien einer Zelle ist essentiell für die Ausbildung eines koordinierten Zilienschlages. So führen Veränderungen in der Anordnung der Basalkörper zu dem „*immobilie-cilia syndrom (Kartagener-Syndrom)*“, einer Erkrankung, bei der der Flüssigkeitstransport in verschiedenen Organen, wie den Atemwegen und dem Reproduktionstrakt gestört ist (Wallmeier et al. 2020).

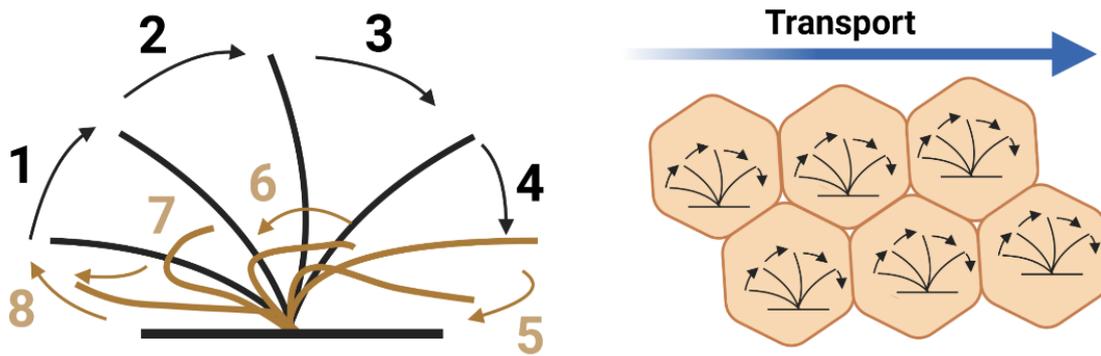
Die Bewegung der Zilien kommt durch das aneinander Vorbeigleiten der A- und B-Mikrotubuli zustande. Essentiell hierfür sind die Dyneinarme, welche als äußere und innere Dyneinarme vorliegen (Abb.3). Die Dyneinarme des A-Tubulus binden an den B-Tubulus und lösen sich anschließend wieder. Dieser Prozess ist ATP-abhängig (Satir und Christensen 2008).



**Abbildung 3: Schematischer Aufbau einer sekundären Zilie.** Die Zilie besteht aus 9 Mikrotubulsdubletten, welche jeweils aus einem A- und B-Mikrotubulus bestehen. Diese sind ringförmig angeordnet, in der Mitte befindet sich ein zentrales Mikrotubuluspaar (9+2). Die Mikrotubulsdubletten sind durch Nexine miteinander verbunden und durch Radiärspeichen ebenfalls mit der inneren Scheide verbunden, welche das zentrale Mikrotubuluspaar umgibt. An den Mikrotubulsdubletten befinden sich innere und äußere Dyneinarme, welche für die Bewegung der Zilien verantwortlich sind. Die Zilie ist durch den aus Mikrotubulstripletten bestehenden Basalkörper (Kinetosom) und dem basalen Fuß in der Zelle verankert.

### 1.2.1.2.2 Der Zilienschlag

Der Zilienschlag ist ein komplexer fein abgestimmter Vorgang, der aus drei Phasen besteht. 1. der effektive Schlag, 2. die Ruhephase, 3. die Rückholbewegung. Die Schlagrichtung weist in Richtung des Pharynx. Bei der ersten Phase wird die maximale Geschwindigkeit des Ziliums erreicht. Dem schließt sich eine Ruhephase an. Darauf folgend wird eine Rückholbewegung durchgeführt, diese erfolgt seitlich nahe an der Zelloberfläche. Die Zilien sind dabei nicht gestreckt. Der effektive Schlag erfolgt 2-3x schneller als die Rückholbewegung (Abb. 4) (Wanner et al. 1996). Die Zilien im Trachealepithel der Maus schlagen dabei mit einer Geschwindigkeit von ca. 18 Hz bei 31 und 37°C (Perniss et al. 2018; Christopher et al. 2014). Wird die Temperatur verringert, sinkt auch die Zilienschlaggeschwindigkeit (*ciliary beat frequency* = CBF), so beträgt diese bei Raumtemperatur nur noch 12 Hz (Francis et al. 2009; Christopher et al. 2014). Findet eine Erhöhung der CBF statt, so verkürzen sich die 3 Phasen. Besonders die Ruhephase, sowie die Rückholbewegung, werden dabei bevorzugt verkürzt (Wanner et al. 1996). Der gerichtete Flüssigkeitstransport ist nicht nur, wie bereits beschrieben, abhängig von der Orientierung der einzelnen Zilien einer Zelle, sondern auch von der Ausrichtung der Zilien der benachbarten Zellen sowie der zeitlichen Synchronisation des Zilienschlages innerhalb einer Zelle, aber besonders des Zellverbandes. Zwischen den einzelnen Zellen liegt ein zeitlicher Versatz im Zilienschlag vor, dieses Phänomen wird als Metachronie bezeichnet. Betrachtet man die gesamte Trachea, so bildet sich eine metachronische Welle aus, welche sich von der Bifurkation in Richtung des Larynx ausbreitet und so den gerichteten Flüssigkeitstransport gewährleistet (Abb. 4) (Wanner et al. 1996). Die Synchronisation der benachbarten Zellen findet dabei über hydrodynamische Interaktionen zwischen den Zilien und der PCL statt (Niedermayer et al. 2008; Yi et al. 2003). Der durch den koordinierten Zilienschlag entstandene Transport der PCL und des Mukus weist in der Trachea der Maus eine Geschwindigkeit von ca. 80  $\mu\text{m/s}$  (37°C) *in vivo* auf (Pieper et al. 2020). Die Messung der Transportgeschwindigkeit *in vivo* ist jedoch sehr aufwändig und komplex und erfolgt durch Anwendung der mikroskopischen optischen Kohärenztomographie (mOCT) (Pieper et al. 2020). Eine alternative Methodik stellt die explantierte Trachea dar. Diese Methodik kam auch in der vorliegenden Arbeit zum Einsatz. Hier liegt die Transportgeschwindigkeit, mit der applizierte Partikel transportiert werden, bei ca. 50  $\mu\text{m/s}$  (31 °C) (Hussong et al. 2013; Klein et al. 2009; Perniss et al. 2018; Perniss et al. 2020a; Perniss et al. 2020b).



**Abbildung 4: Schematische Darstellung des Zilienschlages.** Der Zilienschlag wird in drei Phasen eingeteilt, der effektive Schlag (1-4), die Ruhephase (nicht dargestellt) und die Rückholbewegung (5-8). Der gerichtete Flüssigkeitstransport wird durch die gleichmäßige Orientierung der Zilien einer Zelle und der benachbarten Zellen sowie durch eine zeitliche Synchronisation des Zilienschlages gewährleistet (rechtes Schema).

#### 1.2.1.2.3 Beeinflussung des Zilienschlages

Die Beeinflussung des Zilienschlages erfolgt akut durch die Veränderung der Schlaggeschwindigkeit, nicht aber durch eine Veränderung des Bewegungsablaufes. Die Zilien schlagen spontan aktiv und benötigen keinen Stimulus, um den Zilienschlag in Gang zu setzen (Wanner et al. 1996). Eine Vielzahl an Substanzen beeinflusst akut die CBF. So waren 1996 bereits über 40 Substanzen bekannt, die die CBF erhöhen (Wanner et al. 1996), darunter Pharmaka wie Salbutamol (Devalia et al. 1992), Neurotransmitter und Neuropeptide wie Serotonin (König et al. 2009) und Substanz P (Schuil et al. 1995a), aber auch Acetylcholin (Klein et al. 2009) und 35 weitere Substanzen, welche die CBF erniedrigen (Wanner et al. 1996). Zudem haben bakterielle Produkte ebenfalls einen Einfluss auf die CBF, so zum Beispiel Quorum-sensing-Moleküle (QSM) von *Pseudomonas aeruginosa* (Krasteva et al. 2012a; Hollenhorst et al. 2020). Jedoch stellt ATP den stärksten bekannten Aktivator der CBF dar (Droguett et al. 2017). Diese Substanzen wirken über sekundäre Botenstoffe wie cAMP, cGMP, NO oder Veränderungen der intrazellulären Calcium-Konzentration  $[Ca^{2+}]_i$  (Satir und Christensen 2008). Eine zentrale Rolle nimmt dabei die Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  ein (Lansley und Sanderson 1999; Evans und Sanderson 1999; Schmid und Salathe 2011).

### 1.3. Pathogenerkennung in den Atemwegen

Neben der MC, welche für den Abtransport der eingeatmeten Mikroorganismen zuständig ist, hat sich eine Vielzahl weiterer Abwehrmechanismen in den Atemwegen ausgebildet, die eine Besiedlung mit Pathogenen verhindern. Eine Schlüsselrolle in der Verhinderung einer Besiedlung stellt die schnelle und effektive Erkennung von Mikroorganismen dar. Zu diesem Zweck haben sich eine Reihe sogenannter *pattern recognition receptors* (PRR) entwickelt (Janeway und Travers 2005). Diese Rezeptoren erkennen pathogenspezifische Moleküle (*pathogen-associated molecular patterns* = PAMPs), z.B. Bestandteile bakterieller Zellmembranen (Lipopolysaccharide (LPS), Lipoteichonsäure, Peptidoglykane), bakterielle oder virale RNA oder DNA und andere nicht wirtseigene Moleküle wie Flagellin. Zudem werden aber auch wirtseigene Moleküle erkannt. Dabei handelt es sich um Moleküle, welche normalerweise intrazellulär vorliegen und nur durch Traumata oder Lyse von Zellen freigesetzt werden. Diese Moleküle werden als *damage-associated molecular patterns* (DAMPs) bezeichnet. Beispiele dafür sind ATP, eukaryotische DNA oder das Protein HMGB1 (*high-mobility group protein 1*) (Roh und Sohn 2018). Erfolgt eine Aktivierung dieser Rezeptoren, werden verschiedene Signalkaskaden angestoßen. Es erfolgt z.B. die Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen, antimikrobiellen Peptiden und Chemokinen (Janeway und Travers 2005). Die PRR stellen eine Gruppe verschiedener Rezeptorklassen dar; welche grob in membranständige und intrazellulär vorliegende Rezeptoren eingeteilt werden können. Die membranständigen Rezeptoren sind 1. Scavenger Rezeptoren, 2. C-Typ Lektin-Rezeptoren, 3. Toll-like Rezeptoren (TLR) und 4. Formylpeptid-Rezeptoren (FPR). Die intrazellulär vorliegenden Rezeptortypen sind: NOD-like und RIG-I-like-Rezeptoren (Takeuchi und Akira 2010; Prevete et al. 2015; Bufe und Zufall 2016). PRR werden von verschiedenen Immunzellpopulationen, aber auch von Epithelzellen exprimiert. Insbesondere werden TLR von nicht stimulierten humanen und murinen trachealen Epithelzellen exprimiert (Ioannidis et al. 2013; Greene und McElvaney 2005; Becker et al. 2000).

Neben den PRR werden aber auch andere Rezeptorklassen als mögliche „Pathogensensoren“ beschrieben, ein Beispiel dafür stellen sogenannte „Bitterrezeptoren“ dar (Patel et al. 2018; Lee und Cohen 2014b; Carey et al. 2017; Carey und Lee 2019).

#### 1.3.1 Toll-Like Rezeptoren (TLR)

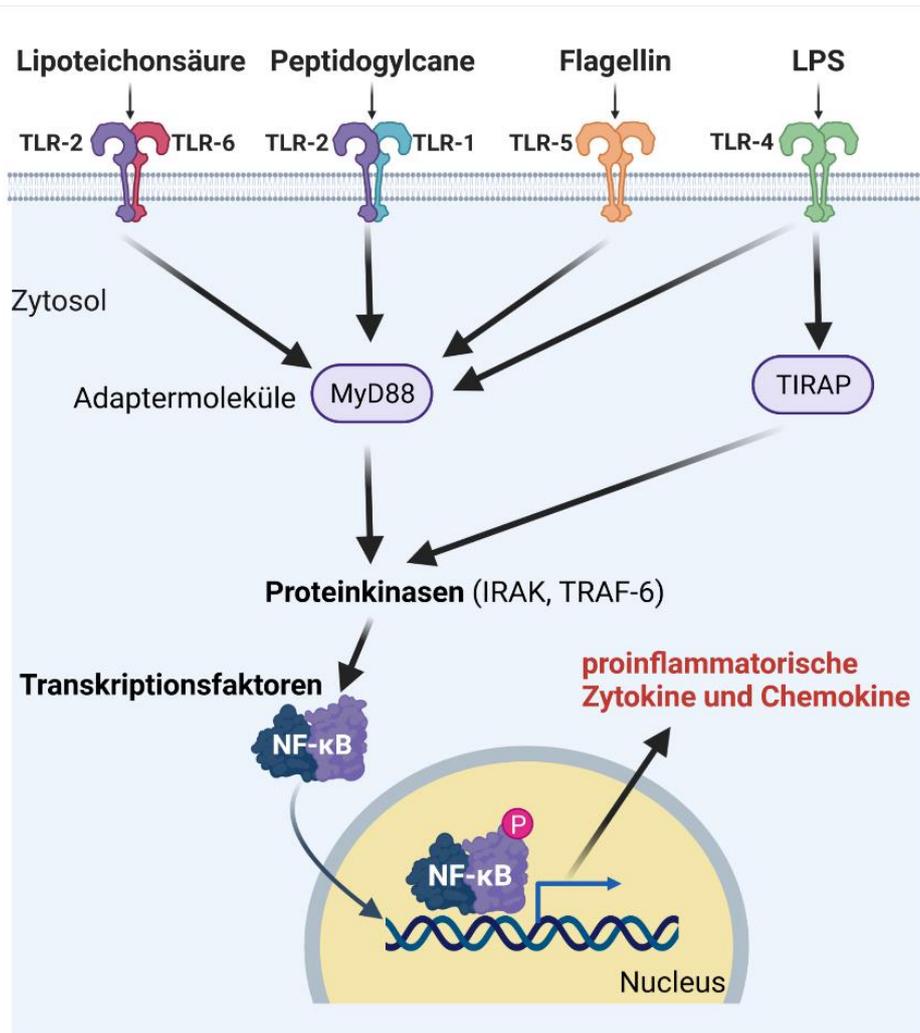
Im menschlichen Genom wurden 10 verschiedene TLR identifiziert (TLR-1-10). In der Maus wurden drei weitere TLR nachgewiesen (TLR-11-13), TLR10 ist jedoch in der Maus nicht funktionell (Takeuchi und Akira 2010; Li und Chen 2012). Die TLR erkennen eine Vielzahl von PAMPs und DAMPs, wobei jeder einzelne Rezeptor ein spezifisches Ligandenmuster aufweist. So erkennt der TLR-4 LPS, Fibrinogen und Hitzeschockproteine, der TLR-2

Lipoproteine, Lipoteichonsäure und Peptidoglykane und der TLR-5 Flagellin (Takeuchi und Akira 2010). Einige TLR bilden funktionelle Dimere aus, so z.B. TLR-2 und TLR-6 oder TLR-1 und TLR-2 (Abb. 5) (Botos et al. 2011).

Bindet ein Ligand an einen TLR, wird eine Signalkaskade initiiert; diese involviert TLR-Adaptermoleküle wie *Toll-Interleukin 1 receptor* (TIR), *domain containing adaptor protein* (TIRAP oder MAL), *TIRAP inducing IFN- $\beta$*  (TRIF), *TRIF-related adaptor molecule* (TRAM) und *myeloid differentiation response protein 88* (MyD88). Dabei ist MyD88 in der Signalkaskade von allen humanen TLR außer dem TLR-3 involviert (Wang et al. 2014). Im Anschluss an die Rekrutierung der Adaptermoleküle erfolgt die Aktivierung von Proteinkinasen wie IRAK (*IL-1R-associated protein kinase*) oder TRAF-6 (*TNF receptor-associated factor 6*), was wiederum final zu einer Translokation von pro-inflammatorischen Transkriptionsfaktoren in den Zellkern führt, so z.B. NF- $\kappa$ B (*nuclear factor kappa-B*) (Kumar et al. 2011). Im Anschluss wird durch die Transkriptionsfaktoren die Transkription von pro-inflammatorischen Zytokinen wie TNF- $\alpha$  (*tumor necrosis factor alpha*), IL-1 $\beta$  (Interleukin 1 $\beta$ ), IL-6, IFN- $\alpha,\beta$  (Interferon- $\alpha,\beta$ ) und Chemokinen wie CXCL8 und CXCL10 sowie von antimikrobiellen Peptiden gestartet (Abb. 5) (Moresco et al. 2011).

Es bestehen jedoch auch MyD88-unabhängige Signalwege, ein Beispiel dafür stellt die Aktivierung des TLR-4 durch LPS dar. In diesem Fall kann ein MyD88-abhängiger von einem MyD88-unabhängigen Signalweg abgegrenzt werden. Bei dem MyD88-abhängigen Signalweg kommt es zu einer Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen, wie IL-6 und IL-1 $\beta$ . Bei dem MyD88-unabhängigen Signalweg kommt es dagegen zu einer Freisetzung von IFN- $\beta$  und im Anschluss zur Freisetzung von interferon-abhängigen Molekülen wie CXCL10 (Akira und Takeda 2004; El-Zayat et al. 2019).

TLR werden von allen Zelltypen, die dem angeborenen Immunsystem zugeordnet werden, exprimiert, darunter Zelltypen wie Makrophagen, Dendritische Zellen, NK-Zellen und Monozyten und neutrophilen Granulozyten. Zudem konnte eine Expression von TLR auch in Zellen des adaptiven Immunsystem (B- und T-Zellen), als auch in epithelialen, endothelialen und Fibroblasten nachgewiesen werden (zusammengefasst von Delneste et al. 2007 und El-Zayat et al. 2019). Ioannidis und KollegInnen konnten die TLR-1,2,3 und 6 in hohem Maße in humanen trachealen Epithelzellen mittels Antikörpermarkierungen nachweisen. Die TLR-4,5,7,9 und 10 waren dagegen nur in geringen Maßen nachzuweisen. Der TLR-8 konnte mittels Antikörpermarkierungen im humanen Trachealepithel dagegen nicht nachgewiesen werden.



**Abbildung 5: Schematische vereinfachte Darstellung des Toll-Like Rezeptor (TLR)-Signalweges.** TLR sind auf der Zellmembran von diversen Zelltypen exprimiert und erkennen wirtsfremde, aber auch wirtseigene Moleküle (PAMPs und DAMPs). Nach dem Binden des Liganden an den TLR werden Adaptermoleküle (MyD88, TIRAP) rekrutiert. Es folgt die Aktivierung von Proteinkinasen (IRAK, TRAF-6), dies hat die Translokation von Transkriptionsfaktoren (NF-κB) in den Nucleus zur Folge, was wiederum zu einer Transkription von Genen codierend für proinflammatorische Cytokine und Chemokine führt.

Ein ähnliches TLR-Expressionsmuster konnte in murinen kultivierten trachealen Epithelzellen mittels Antikörpermarkierung und darauffolgender Durchflusszytometrie beobachtet werden, hier konnten jedoch alle untersuchten TLR (TLR-1-10) in 4-16% der Epithelzellen nachgewiesen werden. Nur 4% der Zellen waren mit Antikörpern gegen den TLR-8 oder TLR-2 markiert, die anderen untersuchten TLR-Antikörper markierten je 10-16% der Zellen. Es wurde in dieser Studie jedoch nicht untersucht, ob einzelne Epithelzellen auch mehr als einen TLR-Typ exprimieren (Ioannidis et al. 2013).

### 1.3.2 Formylpeptid-Rezeptoren (FPR)

FPR weisen ein enormes Ligandenspektrum auf und werden von einer Vielzahl von Zellen myeloiden Ursprungs, aber auch von anderen Zelltypen exprimiert und nehmen aus diesen Gründen eine wichtige Rolle in der Pathogenerkennung ein (Boillat et al. 2021). FPR sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR), welche in der Zellmembran lokalisiert sind. Sie bestehen aus sieben hydrophoben Transmembran-Domänen (Migeotte et al. 2006). Bereits 1975 konnte gezeigt werden, dass neutrophile Granulozyten von dem aus drei Aminosäuren (AS) bestehenden formylierten Peptid f-MLF (Met-Leu-Phe) angezogen werden und sich darauf hinbewegen. Dieser Vorgang wird als Chemotaxis bezeichnet (Schiffmann et al. 1975). Schon in dieser Publikation konnte gezeigt werden, dass für die beobachtete Chemotaxis die Formylierung der AS Methionin essentiell ist.

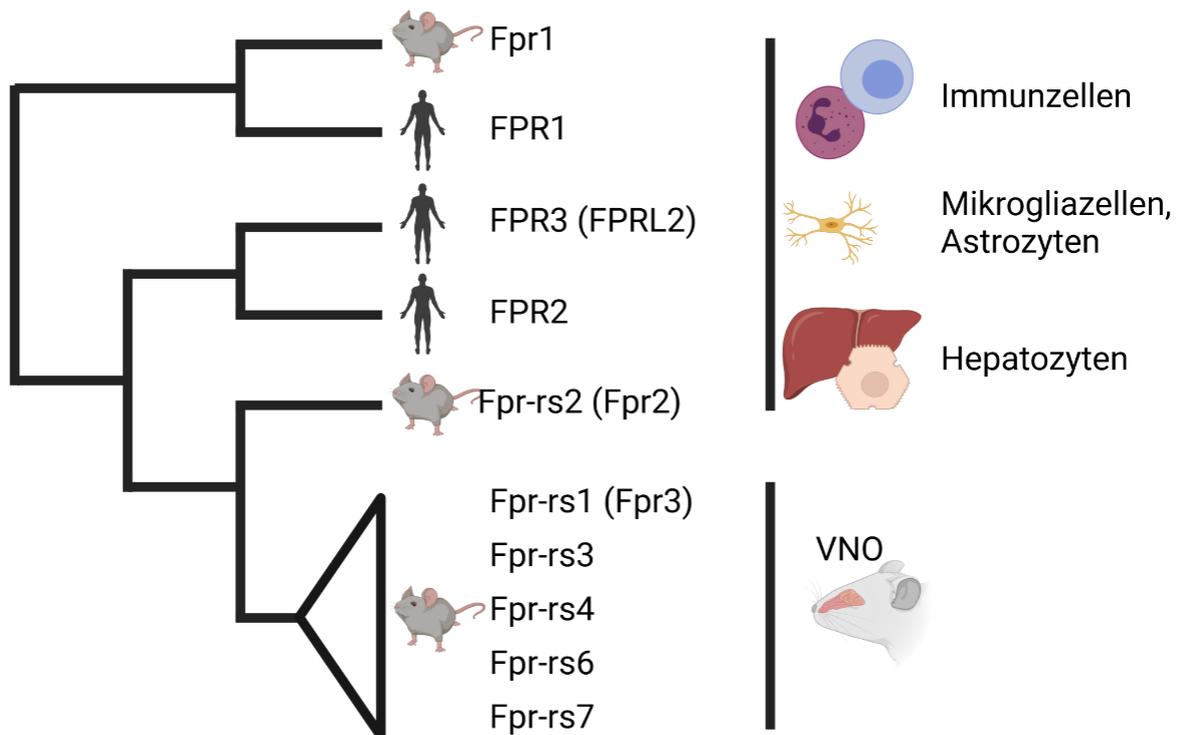
#### 1.3.2.1 Humane und murine FPR

Im menschlichen Genom sind kodierende Sequenzen für drei FPR vorhanden; FPR1, FPR2 (FPRL1) und FPR3 (FPRL2) (Migeotte et al. 2006). Der FPR3 ist während der Evolution der Primaten entstanden und das evolutionär gesehen jüngste Mitglied der FPR-Familie (Muto et al. 2015). Im Gegensatz dazu weisen Nager, im besonderen Mäuse, eine höhere Fpr-Diversität auf. So können in der Maus sieben verschiedenen Fpr-kodierende Gene nachgewiesen werden. Dies sind: *Fpr1*, welches das Ortholog des humanen *FPR1* darstellt, *Fpr2* (Ortholog des humanen *FPR2*) und *Fpr-rs1*, *Fpr-rs2*, *Fpr-rs3*, *Fpr-rs4*, *Fpr-rs6* und *Fpr-rs7* (Abb. 6) (Gao et al. 1998). Jedoch sollte angemerkt werden, dass die Nomenklatur der FPR nicht einheitlich verwendet wird und jeweils im Kontext überprüft werden sollte (Boillat et al. 2021).

#### 1.3.2.2 Expression der FPR

FPR werden von einer Vielzahl von Zelltypen exprimiert. Identifiziert wurde die Expression zuerst in humanen phagozytierenden Leukozyten, insbesondere in Monozyten und neutrophilen Granulozyten (Migeotte et al. 2006). Dabei ist das Expressionsmuster sehr divers. Humane neutrophile Granulozyten exprimieren nur FPR1 und FPR2, Monozyten dagegen exprimieren alle drei humane FPR (Yang et al. 2001). Neben diesen Zelltypen konnte die Expression des humanen FPR1 und des murinen Orthologes *Fpr1* zudem in Dendritischen Zellen und Mikroglia-Zellen nachgewiesen werden (Yang et al. 2002). Der humane FPR3 wird von Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert, nicht jedoch von neutrophilen Granulozyten (Murphy et al. 1992; Yang et al. 2001; Yang et al. 2002). Es ist zudem die Expression der humanen FPR und der murinen *Fpr1-3* in verschiedenen anderen Organen beschrieben, wie Milz, Lunge, Leber und Gehirn, zusammengefasst von Migeotte (Migeotte et al. 2006). Jedoch sollten diese Daten jeweils hinterfragt werden, da in einigen

Fällen die Expression anhand der Präsenz von mRNA im Gesamtgewebe oder isolierten Primärzellen untersucht wurde und eine „Verunreinigung“ durch Immunzellen, welche FPR exprimieren, nicht ausgeschlossen werden konnte (Lunge: (Shao et al. 2010), Gehirn: (Tiffany et al. 2001)). Eine Expression von humanen sowie murinen Fpr (Fpr1 und Fpr-rs2) in Fibroblasten, Thrombozyten und Hepatozyten kann jedoch als gesichert angesehen werden (VanCompernelle et al. 2003; Czapiga et al. 2005; Øie et al. 2016).



**Abbildung 6: Diversität der FPR-Genfamilie im Menschen und in der Maus.** Im humanen Genom sind drei für FPR codierende Gene identifiziert. In der Maus sind dagegen sieben Fpr-codierende Gene vorhanden. Die humanen FPR und die Fpr1 und Fpr-rs2 der Maus werden vor allem von Immunzellen exprimiert, aber auch in Mikrogliazellen, Astrozyten, Hepatozyten, Fibroblasten und Thrombozyten. Die murinen Rezeptoren Fpr-rs1, Fpr-rs2, Fpr-rs3, Fpr-rs4, Fpr-rs6 und Fpr-rs7 werden vermutlich nur von Neuronen des VNO (Vomeronasalorgan) exprimiert.

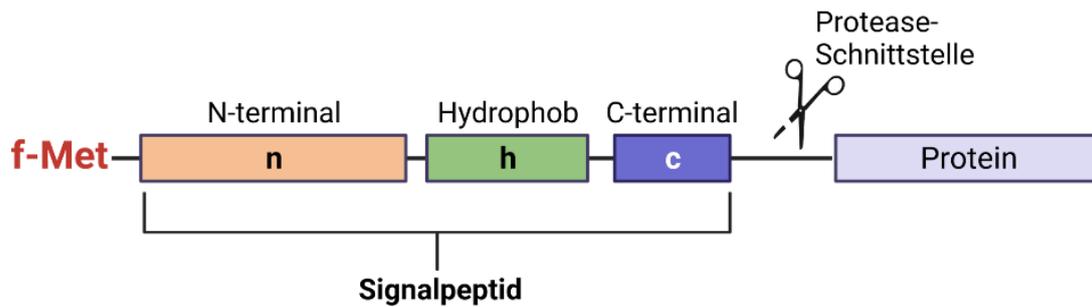
Die murinen FPR-Rezeptoren Fpr-rs1, Fpr-rs3, Fpr-rs4, Fpr-rs6 und Fpr-rs7 wurden in neueren Studien nur in Neuronen des VNO nachgewiesen (Liberles et al. 2009; Rivière et al. 2009). Jedoch wurde mRNA kodierend für den Fpr-rs6 und Fpr-rs7 von Wang und KollegInnen auch in anderen Organen nachgewiesen, wie Milz, Herz, Lunge und Leber (Wang und Ye 2002). Diese Daten konnten jedoch von Riviere und KollegInnen nicht verifiziert werden (Rivière et al. 2009)

### 1.3.2.3 FPR-Liganden

Die FPR wurde nach ihrer Fähigkeit benannt, an das am N-Terminus formylierte Methioninmotiv zu binden, welches von *Escherichia coli* sezerniert wird (Ye et al. 2009). FPR erkennen jedoch nicht nur dieses bakterielle Peptidmotiv. Mittlerweile konnten verschiedene Ligandenklassen identifiziert werden: 1. bakterielle formylierte Peptide, 2. bakterielle nicht formylierte Peptide (z.B. Hp 1-20), 3. wirtseigene mitochondriale formylierte Peptide, 4. wirtseigene nicht formylierte Peptide (z.B. Annexin 1), 5. wirtseigene Nicht-Peptide (z.B. Lipoxin A4), 6. synthetische Liganden (z.B. W-Peptid (WKYVM-NH<sub>2</sub>)) (zusammengefasst von Liu et al. 2013).

Die bakteriellen formylierten Signalpeptide stellen mit über 170.000 annotierten Peptiden (<http://www.signalpeptide.de>, Stand: 27.03.2022) die größte FPR-Ligandenklasse dar (Bufe und Zufall 2016). Signalpeptide können sowohl in Prokaryonten als auch in Eukaryonten an einer Mehrzahl von neu synthetisierten Proteinen gefunden werden, welche entweder sezerniert oder in die Zellmembran eingebaut werden (Bufe und Zufall 2016). Diese Signalpeptide werden, wenn das Protein seinen Zielort erreicht hat, abgeschnitten. Es bestehen aber auch Belege für eine aktive Sezernierung der Signalpeptide durch Bakterien. So konnten sie in Überständen von Bakterienkulturen nachgewiesen werden (Zhang et al. 2020; Bufo et al. 2019).

Signalpeptide bestehen typischerweise aus wenigen AS (<16), aber es konnten auch Komplexe aus mehr als 100 AS bestehende Signalpeptide nachgewiesen werden (Bufe und Zufall 2016). Die Signalpeptide weisen eine charakteristische Struktur auf, bestehend aus einer N-terminalen Region, welche mit einem Methionin beginnt, einer hydrophoben h-Region und einer C-terminalen Region (Abb. 7). Bei bakteriellen Signalpeptiden liegt das am N-Terminus befindliche Methionin formyliert vor; dieser Unterschied ist essentiell für die Unterscheidung von wirtseigenen und wirtsfremden Signalpeptiden durch das Immunsystem (Bufe und Zufall 2016; Lacy 1995). Die N-terminale Region ist in ihrer Sequenz und Länge hoch variabel und kann aus 2-80 AS bestehen, diese Variabilität ermöglicht die enorme Vielfalt der Signalpeptide. Die h-Region ist ebenfalls variabel und weist eine Länge von 8-20 AS auf. Die C-terminale Region besteht nur aus 5-6 AS und beinhaltet eine Schnittstelle für Peptidasen (Abb. 7) (Bufe und Zufall 2016). Die Liganden der FPR aktivieren eine Signaltransduktion bereits in Konzentrationen im Bereich von nM bis  $\mu$ M; dies konnte *in vitro*, aber auch *in vivo* gezeigt werden (Bufo et al. 2015; Bufo et al. 2019).



**Abbildung 7: Schematische Darstellung der Struktur von bakteriellen Signalpeptiden.**

#### 1.3.2.4 FPR-Signalweg und Funktionen

Wie bei anderen GPCR führt die Ligandenbindung zu einer Dissoziation des assoziierten G-Proteins in seine drei Untereinheiten. Im Anschluss kommt es durch die nun freigesetzte  $\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins zu einer Aktivierung der Phospholipase C (PLC), dies führt über Zwischenschritte zu einer Freisetzung von Calcium aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) und so zu einer Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  (Migeotte et al. 2006). In humanen und murinen neutrophilen Granulozyten wird dadurch eine FPR1 und FPR2 (Fpr1 und Fpr2) vermittelte Chemotaxis oder die Produktion von ROS (Reaktive Sauerstoffspezies) ausgelöst (Forsman et al. 2013; Bylund et al. 2003). Angelockte Neutrophile phagozytieren im Anschluss die Bakterien, welche die Peptide freigesetzt haben, oder töten diese durch die Produktion von ROS ab (Janeway und Travers 2005). Die ROS-Produktion konnte ebenfalls in Fibroblasten nachgewiesen werden (Napolitano et al. 2018). In Thrombozyten führt die Aktivierung des FPR1 und FPR2 ebenfalls zu einer Chemotaxis (Czapiga et al. 2005).

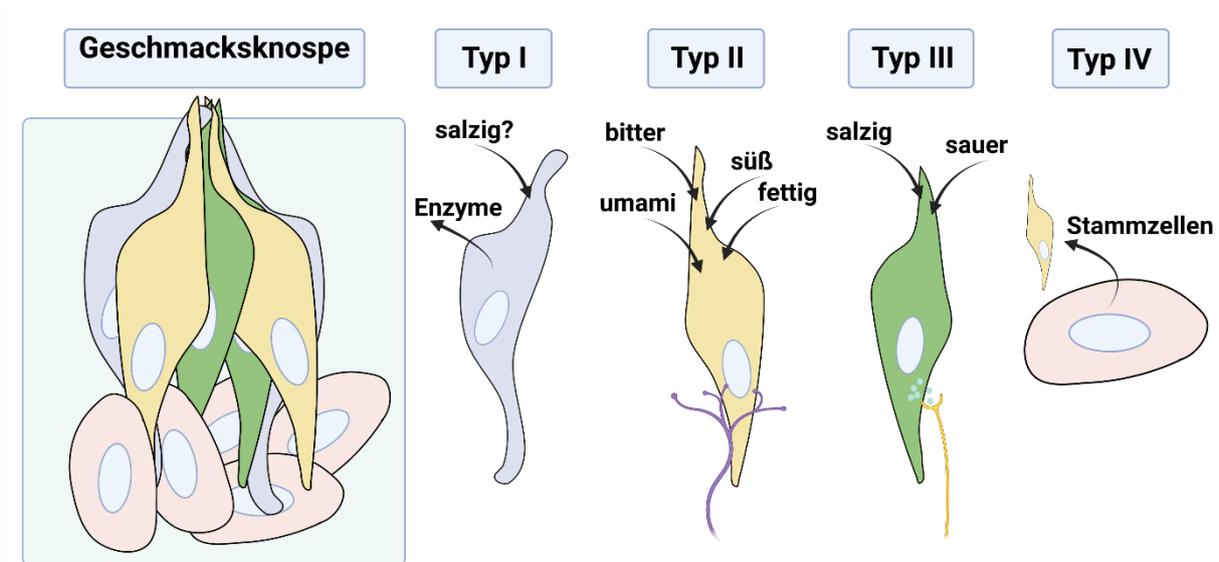
Die Funktion der VNO-spezifischen murinen Fpr konnte in einer Publikation von Bufe und KollegInnen erstmals beschrieben werden (Bufe et al. 2019). Es wurde gezeigt, dass der Fpr1 von einer Subpopulation von olfaktorischen Neuronen im VNO exprimiert wird. Die Aktivierung durch synthetische Agonisten, aber auch durch ein bakterielles formyliertes Peptid (f-MKKFRW), führte bei Mäusen zu einem Meidungsverhalten. Die AutorInnen schlussfolgerten aus den Ergebnissen dieser Studie, dass Mäuse, welche von Pathogenen besiedelt wurden, durch Artgenossen gemieden werden, und dass dieser Effekt teilweise Fpr-abhängig ist (Bufe et al. 2019).

Eine FPR-unabhängige Wahrnehmung von formylierten bakteriellen Signalpeptiden ist nach meinen Recherchen noch nicht beschrieben.

### 1.3.3 Geschmacksrezeptoren

Der Geschmackssinn schützt zum einen den Organismus, zum anderen steuert er die Aufnahme von Nahrungsmitteln. Es werden im klassischen Sinne fünf Geschmacksmodalitäten voneinander abgegrenzt, diese sind: salzig, süß, bitter, umami und sauer (Finger und Kinnamon 2011). Es werden jedoch weitere Geschmacksmodalitäten diskutiert, z.B. die Wahrnehmung von fettig oder von Malto-Oligosacchariden (Sclafani 2004; Besnard et al. 2016).

Die Wahrnehmung von bitter und sauer verhindert die Aufnahme von möglicherweise toxischen Substanzen (bitter) oder starken Säuren (sauer). Im Gegensatz dazu steht die Wahrnehmung von süß, umami (L-Glutamat) und salzig, diese Geschmacksmodalitäten regen zur Nahrungsaufnahme an (Finger und Kinnamon 2011). Die Wahrnehmung der Geschmacksmodalitäten findet in den Geschmacksknospen der Zunge statt. Diese bestehen wiederum aus einzelnen, verschiedenartigen Geschmackszellen (50-100 Zellen pro Geschmacksknospe). Werden diese aktiviert, senden sie Signale über Nervenfasern ins Gehirn; als Transmitter dient dabei vor allem ATP oder Serotonin (Kinnamon und Finger 2019). Es können mindestens vier verschiedene Typen von Geschmackszellen voneinander abgegrenzt werden: Typ I-Zellen werden als unterstützende Zellen gesehen. Sie weisen Ähnlichkeiten zu Astrozyten auf und sind vermutlich nicht aktiv an der Geschmackswahrnehmung beteiligt. Sie stellen mehr als 50% der Zellen innerhalb einer Geschmacksknospe dar und produzieren Enzyme und Transporter, welche für die Degradierung und Wiederaufnahme von Neurotransmittern benötigt werden. Typ II-Zellen; sind für die Wahrnehmung von süß, bitter, sauer, fettig und umami verantwortlich. Diese Geschmacksmodalitäten werden über GPCR wahrgenommen. Typ III-Zellen sind für die Wahrnehmung von salzig und sauer verantwortlich, vermutlich über Ionenkanäle. Typ IV-Zellen sind nicht ausdifferenzierte Geschmackszellen und ebenfalls nicht aktiv an der Geschmackswahrnehmung beteiligt (Abb. 8) (Kinnamon und Finger 2019).



**Abbildung 8: Schematische Darstellung der Zelltypen in einer Geschmacksknospe der Zunge.** Typ I-Zellen sind unterstützende Zellen, sie sind nicht aktiv an der Geschmackswahrnehmung beteiligt, sezernieren unter anderem Enzyme, welche die anderen Zelltypen unterstützen. Es wird aber auch eine Expression des ENaC in Typ I-Zellen diskutiert, was auf eine Wahrnehmung der Geschmacksqualität salzig hindeuten könnte. Typ II-Zellen exprimieren Rezeptoren für die Wahrnehmung von bitter, umami, fettig und süß. Diese Zellen stehen in Kontakt zu Nervenfasern. Typ III-Zellen, exprimieren Rezeptoren für die Wahrnehmung von salzig und sauer, sie bilden Synapsen mit Nervenfasern aus und setzen Serotonin als Transmitter frei. Typ IV-Zellen sind nicht ausdifferenzierte Geschmackszellen und stellen die Stammzellpopulation in den Geschmacksknospen dar, aus denen die anderen Typen hervorgehen.

Die Wahrnehmung der Geschmacksqualität sauer findet über den Ionenkanal OTOP1 (Otopetrin 1) statt. Dieser Kationenkanal wurde erst 2018 in Geschmackszellen identifiziert (Tu et al. 2018). Typ III-Geschmackszellen von Mäusen, in denen das *Otop1*-Gen entfernt wurde, zeigten keine Reaktion auf pH-Veränderungen, im Gegensatz zu den Wildtyp-Tieren (Teng et al. 2019; Zhang et al. 2019). Zuvor wurde der Rezeptor PKD2L1 (*polycystic kidney disease 2-like 1* oder *TRPP2*) für die Wahrnehmung von sauer verantwortlich gemacht; dieser wird ebenfalls von Typ III-Geschmackszellen exprimiert (Huang et al. 2006; LopezJimenez et al. 2006; Ishimaru et al. 2006). Jedoch zeigten spätere Studien, dass Geschmackszellen gendefizienter Tiere (*Pkd2l1* und *Pkd2l3*) immer noch auf Veränderungen des pH-Wertes reagierten, wenn auch etwas geringer (Abb. 9) (Horio et al. 2011; Nelson et al. 2010).

Die Geschmacksqualität salzig wird vermutlich über den ENaC wahrgenommen, jedoch besteht auch eine nicht ENaC bzw. nicht amiloridsensitive Perzeption von salzig (Heck et al. 1984). Zudem sprechen weitere Expressions- sowie Funktionsanalysen gegen eine rein ENaC-vermittelte Salzigwahrnehmung. So konnte von Lossow und KollegInnen in den einzelnen Geschmackszellen keine Co-Expression der  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit des ENaC nachgewiesen werden. Die AutorInnen postulierten daraus, dass sich kein funktioneller ENaC ausbilden kann, da dafür typischerweise alle drei Untereinheiten notwendig sind. Die

Expression der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit konnte sowohl in Typ I- als auch Typ III-Zellen beobachtet werden, wobei die Expression der  $\alpha$ -Untereinheit auf Typ III-Zellen beschränkt war. (Vandenbeuch und Kinnamon 2020a; Lossow et al. 2020). Demgegenüber stehen Experimente von Canessa und KollegInnen sowie von Baldin und KollegInnen, welche zeigen konnten, dass die  $\alpha$ -Untereinheit allein in der Lage ist, einen funktionellen Kanal auszubilden (Baldin et al. 2020; Canessa et al. 1994) (Abb. 9).

Wie die Geschmacksqualität fettig wahrgenommen wird, ist noch nicht abschließend geklärt. Drei Rezeptoren, welche eine Rolle spielen könnten, sind die GPCR40 und 120 sowie CD36 (*cluster of differentiation 36*) (Besnard et al. 2016). Mäuse, welche eine Deletion von *Gpcr40* oder *Gpcr 120* aufweisen, zeigten eine verminderte Reaktion auf freie Fettsäuren (*FFA-free fatty acid*) (Cartoni et al. 2010). Eine andere Studie von Scafani und KollegInnen konnte jedoch keine Abhängigkeit der oralen Wahrnehmung von FFA durch diese Rezeptoren belegen, obwohl die gleichen gendefizienten Mausmodelle verwendet wurden (Scafani et al. 2013). CD36 wird ebenfalls von Geschmackszellen exprimiert und ist bekannt dafür, durch FFA aktiviert zu werden. Die Inaktivierung des CD36-Gens führte ebenfalls zu einer verminderten FFA-Wahrnehmung (Laugerette et al. 2005; Scafani et al. 2007a). Interessant ist, dass die Wahrnehmung von Fett (Sojabohnenöl) abhängig von dem Ionenkanal TRPM5 (*Transient receptor potential cation channel subfamily M member 5*), jedoch nicht von  $\alpha$ -Gustducin ist (Scafani et al. 2007b; Liu et al. 2011) (Abb. 9).

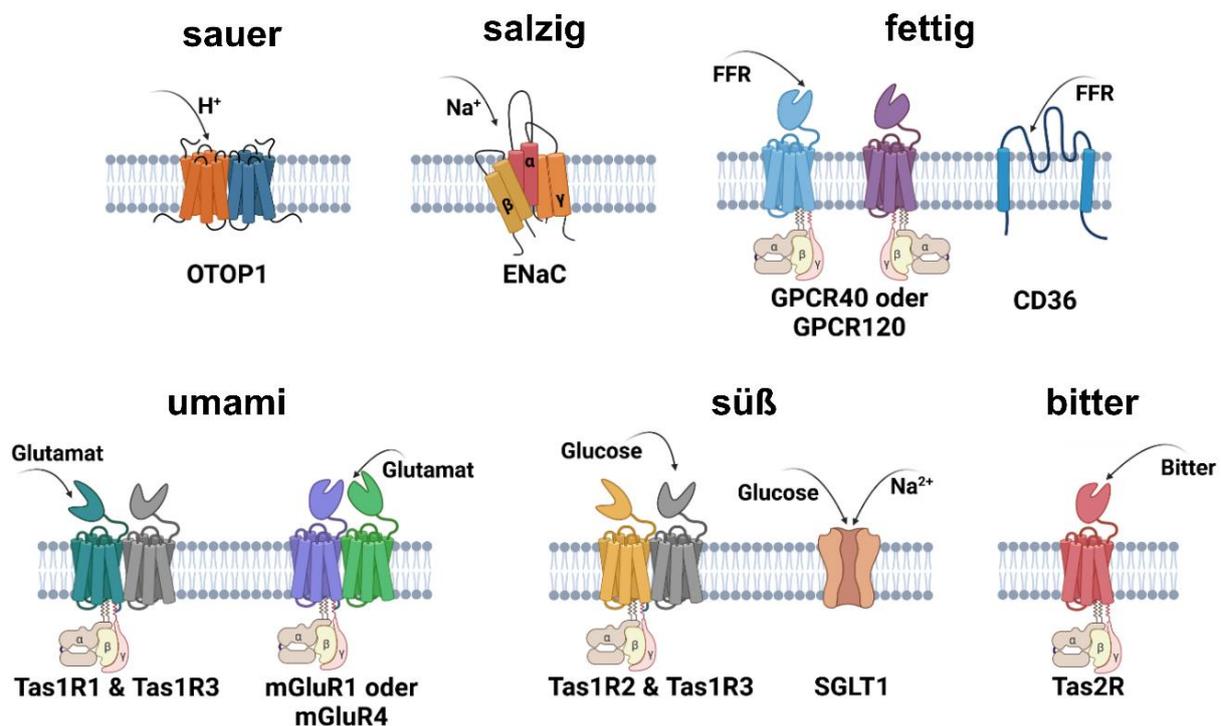
L-Glutamat kommt in hohen Konzentrationen in einer Vielzahl an Lebensmitteln vor, wie z.B. Käse, Meeresfrüchte und in einigen Gemüsen (Vandenbeuch und Kinnamon 2016). Die Wahrnehmung der Geschmacksqualität umami (L-Glutamat) findet vermutlich über die GPCR Tas1R1 und Tas1R3 statt, welche zusammen einen heterodimeren Rezeptor ausbilden. In der Maus werden durch diesen alle L-AS erkannt, der humane heterodimere Rezeptor weist jedoch nur L-Glutamat als natürlichen Liganden auf. Der Rezeptor wird ebenso durch 5'-Ribonucleotide und GMP aktiviert. Wenn diese vorhanden sind, wird die Antwort auf L-Glutamat nochmals verstärkt (Nelson et al. 2002; Li et al. 2002). Mäuse, welche eine Deletion eines Rezeptors (Tas1R1 oder Tas1R2) aufweisen, zeigten in einigen Studien keine Antwort mehr auf Glutamat (Zhao et al. 2003). Dagegen konnte in anderen Studien eine Restreaktion beobachtet werden (Damak et al. 2003; Kusuhara et al. 2013; Delay et al. 2006). Diese Studien sprechen für weitere Rezeptoren, welche an der Umami-Wahrnehmung beteiligt sein könnten. Weitere Kandidaten stellen die metabotropen Glutamatrezeptoren (mGluR) dar, vor allem der mGluR4. Dieser wird in Geschmackszellen exprimiert und löst, wenn er durch L-Glutamat aktiviert wird, Nervenaktivität aus, welche von Geschmackszellen ausgeht. So weisen Tiere, welche für den mGluR4 defizient sind, eine verminderte Reaktion auf L-Glutamat auf (Chaudhari et al. 2000; Yasumatsu et al. 2015; Kusuhara et al. 2013). Zudem konnte der

mGluR1 ebenfalls in Geschmackszellen nachgewiesen werden. Agonisten für diesen Rezeptor führten ebenfalls zu einer Aktivierung der Geschmackszellen (Toyono et al. 2003; Nakashima et al. 2012). Vermutet wird, dass unterschiedliche L-Glutamat-Konzentrationen verschiedene Rezeptoren aktivieren, welche von unterschiedlichen Geschmackszellen exprimiert werden, und so gezielt einzelne Nervenfasern Signale an das Gehirn senden, was wiederum unterschiedliche Reaktionen hervorruft (Vandenbeuch und Kinnamon 2016) (Abb. 9).

Die Wahrnehmung der Geschmacksmodalität süß erfolgt zum überwiegenden Teil über Tas1R2- und Tas1R3-Heterodimere. Eine initiale Studie beschrieb, dass für einen der beiden Rezeptoren gendefiziente Tiere nach Stimulation durch diverse Süßstoffe weder eine Veränderung im Verhalten, noch neuronale Reaktionen aufwiesen (Zhao et al. 2003). Spätere Studien konnten jedoch noch Reaktionen auf die Zucker Glucose und Saccharose beobachten, wenn auch im Vergleich zum Wildtyp reduziert (Damak et al. 2003; Sukumaran et al. 2016). Diese Studien legten nahe, dass ein weiterer, Tas1R-unabhängiger Signalweg besteht. Als ein möglicher Kandidat wurde 2011 der *sodium-glucose cotransporter 1* (SGLT1) identifiziert. Dieser ist in Typ II-Geschmackszellen, welche auf Süßstoffe reagieren, exprimiert (Yee et al. 2011). Yasumatsu und KollegInnen konnten zeigen, dass Glucose in Tas1R3-gendefizienten Tieren eine durch SGLT1 vermittelte Reaktion hervorrief. Diese war jedoch von einer vorherigen Applikation einer geringen Konzentration von Natrium abhängig und konnte durch einen SGLT1-Inhibitor vermindert werden (Yasumatsu et al. 2020). Weitere Experimente lassen schlussfolgern, dass mindestens drei verschiedenen Zelltypen von Typ II-Geschmackszellen an der Wahrnehmung von süß beteiligt sind; der erste Zelltyp exprimiert nur das Tas1R2/Tas1R3-Heterodimer, der zweite exprimiert nur den SGLT1-Transporter und der dritte Zelltyp exprimiert sowohl Tas1R2/Tas1R3 als auch SGLT1 (Yasumatsu et al. 2020; Vandenbeuch und Kinnamon 2020b) (Abb. 9).

Die Wahrnehmung der Geschmacksmodalität bitter erfolgt über Rezeptoren der GPCR-Familie Tas2R. Das Verhindern der Aufnahme von möglichen toxischen Substanzen ist für den Körper von enormer Wichtigkeit, daher hat sich eine Vielzahl von Rezeptoren entwickelt, welche mit hoher Genauigkeit und Spezifität Stoffe erkennen, die dem Organismus schaden könnten (Behrens und Meyerhof 2013). Diese Rezeptorklasse besteht aus 34 funktionellen Rezeptoren in der Maus und aus 25 im Menschen (Go et al. 2005). Diese Rezeptoren weisen ein sehr unterschiedliches Ligandenmuster auf; so erkennen einige Rezeptoren wie der humane TAS2R7 oder der murine Tas2r105 jeweils eine Vielzahl an Liganden. TAS2R7 erkennt 14 und Tas2r105 erkennt 44 Liganden, dagegen weisen andere ein sehr spezielles Ligandenmuster auf und reagieren nur auf einzelne Liganden. Beispielsweise reagiert der humane TAS2R5 nur auf Cycloheximid (CHX) und der murine Tas2r113 nur auf

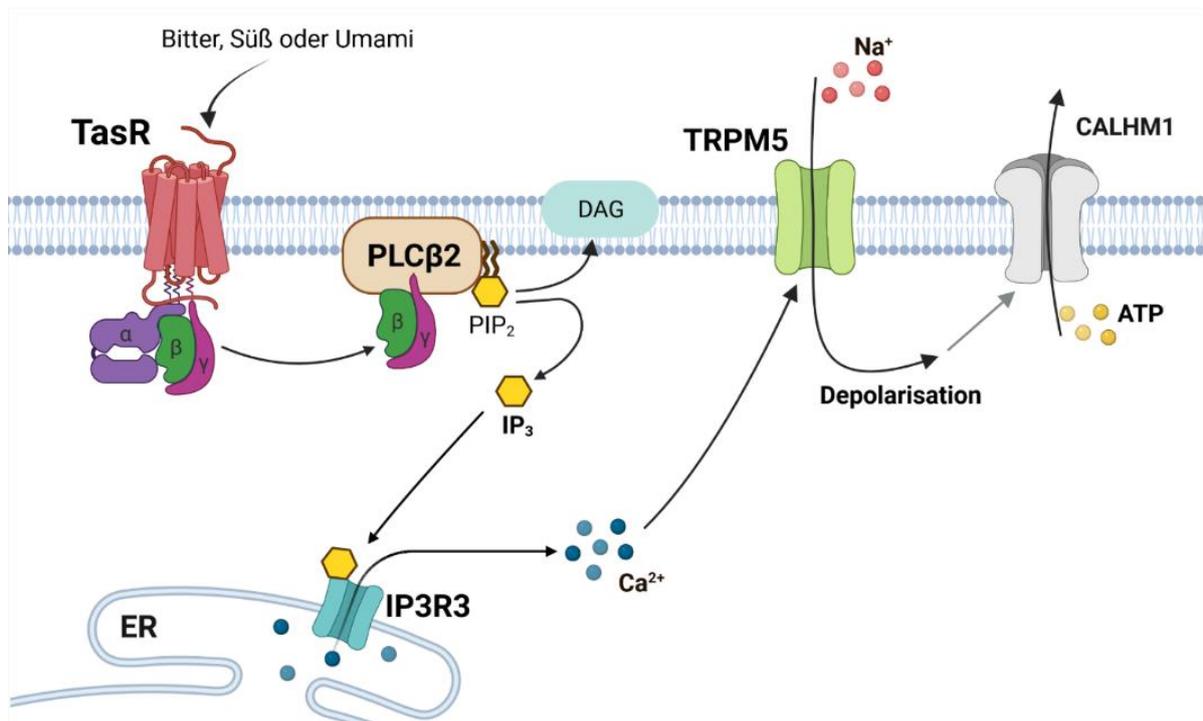
Phenylbutazon (Lossow et al. 2016; Sainz et al. 2007). Es konnten bereits für 21 der 25 humanen Bitterrezeptoren Liganden identifiziert werden, dagegen sind 13 der 34 murinen Rezeptoren sogenannte *orphan receptors* ohne bekannte Liganden (Lossow et al. 2016). Die Konzentrationen, bei denen die Agonisten Bitterrezeptoren aktivieren, sind ebenso divers. So wird der humane TASR43 bereits in nM-Konzentrationen durch Strychnin oder Aristolochiasäure (beides Pflanzengifte) aktiviert, dagegen aktivieren Colchicin und Salizin den TAS2R4 bzw. den TAS2R16 erst in Konzentrationen von >1 mM (Behrens und Meyerhof 2013) (Abb. 9).



**Abbildung 9: Schematische Darstellung der Rezeptoren verantwortlich für die Wahrnehmung der Geschmacksmodalitäten sauer, salzig, fettig, umami, süß und bitter.** Die Geschmacksmodalität sauer wird über den Kationenkanal OTOP1, welcher als Dimer in der Zellmembran von Typ III-Zellen vorliegt, wahrgenommen. Die Geschmacksmodalität salzig wird vermutlich über den ENaC wahrgenommen, welcher von Typ I- und Typ III-Zellen exprimiert wird. Die Geschmacksmodalität fettig kann über mehrere Rezeptoren wahrgenommen werden, darunter GPCR40 und GPCR120, oder CD36. Welcher Rezeptortyp der wichtigste in den Geschmackszellen ist, bleibt noch ungeklärt. Diese Rezeptoren sind in Typ II-Zellen exprimiert. Die Geschmacksmodalität umami (L-Glutamat) wird über die heterodimeren Geschmacksrezeptoren Tas1R1 und Tas1R3, wahrgenommen. Es besteht jedoch ein alternativer Weg zur Wahrnehmung von Glutamat; dieser involviert die Rezeptoren mGluR1 und mGluR4. Die Rezeptoren für die Umami-Wahrnehmung werden von Typ II-Zellen exprimiert. Die Geschmacksmodalität süß wird über die heterodimeren Geschmacksrezeptoren Tas1R2 und Tas1R3, wahrgenommen. Es besteht jedoch ein alternativer Weg zur Wahrnehmung von süß, dieser involviert den Co-Transporter SGLT1. Die Rezeptoren und der Co-Transporter für die Süß-Wahrnehmung werden von Typ II-Zellen exprimiert. Die Geschmacksmodalität bitter wird über die Geschmacksrezeptoren der Tas2R-Familie wahrgenommen, diese werden von Typ II-Zellen exprimiert.

### 1.3.3.1 Geschmackstransduktionskaskade

Die TasR GPCR (Tas1R, Tas2R), welche für die Wahrnehmung der Geschmacksmodalitäten süß, bitter und umami verantwortlich sind, weisen nach Rezeptoraktivierung den gleichen nachfolgenden Signalweg auf, welcher als „Geschmackstransduktions-kaskade“ bezeichnet wird. An den TasR ist ein heterotrimeres G-Protein gekoppelt, welches aus einer  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit besteht, wobei die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit als Dimer zusammengelagert sind (Margolskee 2002) (Abb. 10). In den Geschmackszellen konnten verschiedene  $\alpha$ -Untereinheiten identifiziert werden, darunter  $\alpha_{i-2}$ ,  $\alpha_{i-3}$ ,  $\alpha_{i-14}$ , aber die  $\alpha$ -Untereinheit, welche dominant exprimiert ist, ist  $\alpha_{i-3}$ -Gustducin welche auch als GNAT3 bezeichnet wird (GNAT3 = Guanine nucleotide-binding protein G(t) subunit alpha-3) (Margolskee 2002). Im inaktiven Zustand ist Guanosindiphosphat (GDP) an die  $\alpha$ -Untereinheit gebunden. Bindet ein Ligand an den TasR, wird dieses GDP durch Guanosintriphosphat (GTP) ausgetauscht und das G-Protein zerfällt in die  $\alpha$ -Untereinheit und in ein aus der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit bestehendes Dimer. Dieses Dimer bindet an das membranständige Enzym Phospholipase C $\beta$ 2 (PLC $\beta$ 2) (Yan et al. 2001; Chaudhari und Roper 2010). Dieses Enzym spaltet Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP $_2$ ) in Inositoltriphosphat (IP $_3$ ) und Diacylglycerin (DAG). Das freigesetzte IP $_3$  bindet an IP $_3$ -Rezeptoren des Typs 3 (IP $_3$ R3), welche in der Membran des ER lokalisiert sind. Dies führt zum Ausstrom von Ca $^{2+}$ -Ionen aus dem ER in das Zytosol (Narukawa et al. 2009; Clapp et al. 2001). Diese Erhöhung der [Ca $^{2+}$ ] wiederum führt zu einer Öffnung des membranständigen Kationenkanals TRPM5. Durch diesen Kanal strömen große Mengen an Na $^+$ -Ionen in die Zelle ein, was zu einer Änderung des Membranpotentials und folglich zu einer Depolarisation der Zelle führt (Dutta Banik et al. 2018). Dies führt in Typ II-Geschmackszellen zu einer Freisetzung von ATP über spannungsgesteuerte Hemikanäle, wie dem CALHM1 (*calcium homeostasis modulator 1*) (Taruno et al. 2013). ATP dient als Transmitter und bindet an P $2X$ -Rezeptoren auf sensorischen Nervenfasern. Dies führt zu einer Weiterleitung an das Gehirn und ruft im Fall einer Bittersubstanz verschiedene Schutzreflexe aus (Finger und Kinnamon 2011; Finger et al. 2005; Chaudhari und Roper 2010). Zusätzlich bindet das freigesetzte ATP an P $2Y$ -Rezeptoren, welche von Typ III-Geschmackszellen exprimiert werden. Dies führt zu einer Freisetzung von Serotonin aus Typ III-Zellen und ebenfalls zu einer Aktivierung von sensorischen Nervenfasern. Jedoch werden P $2Y$ -Rezeptoren auch von Typ II-Zellen selbst exprimiert. Es wird angenommen, dass von Typ II-Zellen freigesetztes ATP auch wieder an Typ II-Zellen bindet und so ein negativer Feedback-Loop ausgelöst wird, welcher für eine Feinsteuerung der Signale zum Gehirn verantwortlich ist (Chaudhari und Roper 2010; Roper 2009).



**Abbildung 10: Schematische Darstellung der Geschmackstransduktionskaskade in Typ II-Geschmackszellen.** Ein heterotrimeres G-Protein, bestehend aus einer  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit, ist an den TasR gebunden. Bindet ein Ligand an den TasR, dissoziiert das G-Protein und ein Dimer aus der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit bindet an das Enzym PLC $\beta$ 2. Dadurch wird über die Spaltung von PIP<sub>2</sub> IP<sub>3</sub> und DAG freigesetzt. IP<sub>3</sub> bindet an den IP3R3, was eine Ausschüttung von Ca<sup>2+</sup>-Ionen aus dem ER in das Zytosol zur Folge hat. Dies führt zu einer Aktivierung des Kationenkanals TRPM5, was wiederum zum Einstrom von Na<sup>+</sup>-Ionen in die Zelle führt. Dies resultiert in einer Depolarisation der Geschmackszelle und Freisetzung von ATP über Hemikanäle wie CALHM1.

### 1.3.3.2 Extraorale Bitterrezeptorexpression

Die Expression der Geschmacksrezeptoren und deren Transduktionskaskade ist jedoch nicht nur auf die Geschmackszellen der Zunge beschränkt. So konnten TasR in verschiedenen Organen nachgewiesen werden, z.B. Tas1R im Pankreas und Darm. Im Pankreas wird Tas1R von  $\beta$ -Zellen exprimiert und ihm wird eine Rolle in der Insulinsekretion zugesprochen (Kojima et al. 2014; Kyriazis et al. 2012).

Die Expression der Bitterrezeptoren (Tas2R) ist noch weiter verbreitet, so werden diese z.B. von humanen glatten Muskelzellen exprimiert. Deshpande und KollegInnen konnten mRNA für 17 der 25 humanen Tas2R in glatten Muskelzellen der Atemwege nachweisen (Deshpande et al. 2010). Zudem konnte gezeigt werden, dass Tas2R-Agonisten (Chloroquin und Denatonium) eine relaxierende Wirkung auf diese Zellen hatten (Deshpande et al. 2010). Ebenso sind verschiedene Tas2R im Hoden exprimiert und für die Spermatogenese essentiell (Xu et al. 2012; Mosinger et al. 2013).

Shah und KollegInnen konnten zeigen, dass humane zilientragende Zellen der Atemwege TAS2R und TAS1R, sowie Komponenten der Geschmackstransduktionskaskade (TRPM5, PLC $\beta$ 2, GNAT3) exprimieren. Der Nachweis erfolgte durch Antikörpermarkierungen und durch RT-PCR-Experimente (Shah et al. 2009). In einer weiteren Studie von Lee und KollegInnen markierten Antikörper gegen den Tas2R38 ebenfalls die Zilien von humanen Atemwegsepithelzellen in Kultur. Diese Zellen reagierten auf den Bitterstoff Phenylthiocarbamid (PTC) und auf von *Pseudomonas aeruginosa* produzierte QSM mit einem Anstieg der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> und anschließender Freisetzung von NO (Stickstoffmonoxid), welches eine bakterizide Wirkung aufwies (Lee et al. 2012).

In einer Studie von Tizzano und KollegInnen konnte dagegen keine Expression von TRPM5, PLC $\beta$ 2, GNAT3 und TasR in den zilientragenden Zellen der Atemwege von Mäusen festgestellt werden (Tizzano et al. 2011). Ähnliche Ergebnisse wurden von Krasteva und KollegInnen veröffentlicht. Auch hier konnte keine Expression der oben genannten Moleküle in zilientragenden Zellen nachgewiesen werden (Krasteva et al. 2011). In zwei voneinander unabhängigen Studien konnte in Einzelzell-RNA-Sequenzierungen von murinen sowie humanen trachealen Epithelzellen keine Expression von mRNA für TasR oder Elemente der Geschmackstransduktionskaskade (PLC $\beta$ 2, GNAT, TRPM5) in zilientragenden Zellen beobachtet werden (Montoro et al. 2018; Plasschaert et al. 2018).

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass vermutlich ein spezies-spezifischer Unterschied in der Expression von Tas2R und der Geschmackstransduktionskaskade zwischen humanen und murinen zilientragenden Atemwegsepithelzellen besteht. Zudem stammen die Ergebnisse von Shah und KollegInnen sowie die von Lee und KollegInnen von humanen Primärzellen welche in Kultur gehalten wurden (Lee et al. 2012; Shah et al. 2009). Möglicherweise könnten die Kulturbedingungen ebenfalls die Expression der TasR sowie derer Geschmackstransduktionskaskade beeinflusst haben.

Die Expression von TasR und Elementen der Geschmackstransduktionskaskade konnte jedoch in einem anderem murinen Atemwegsepithelzelltyp sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden, den SCC (Kaske et al. 2007; Tizzano et al. 2011; Krasteva et al. 2011; Montoro et al. 2018; Plasschaert et al. 2018) (Abb. 1).

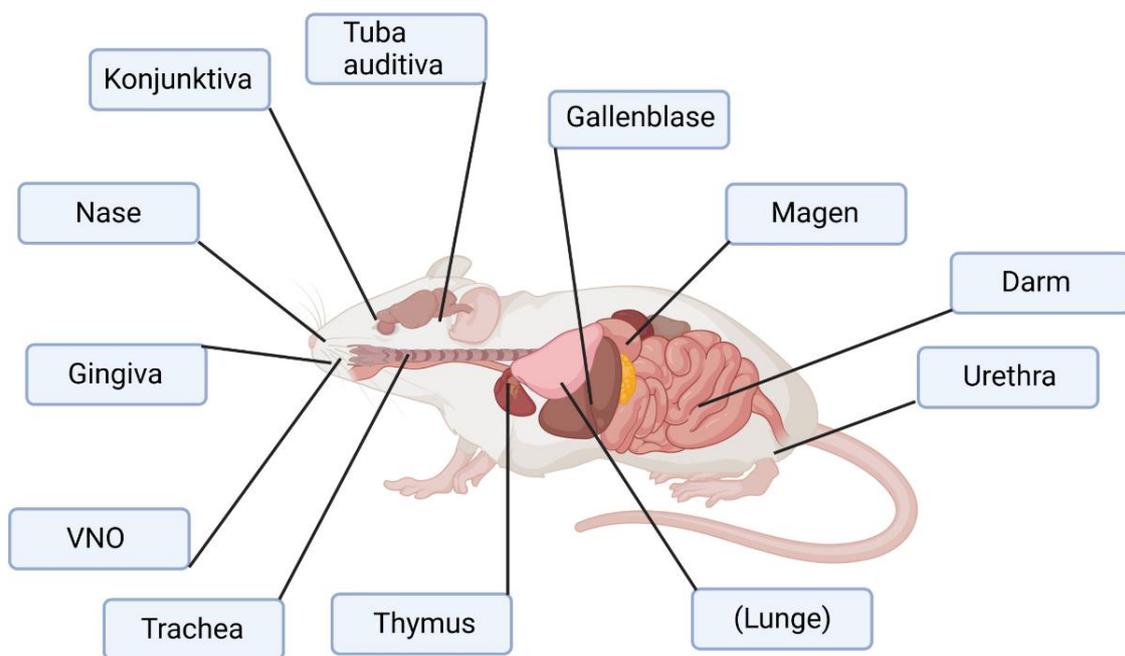
## 1.4 Solitäre Chemosensorische Epithelzellen

Die Morphologie, Funktion und Anzahl von SCC unterscheidet sich zwischen den verschiedenen Lokalisationen im Organismus. Charakteristisch für diesen Zelltyp ist unabhängig von der Lokalisation jedoch das Vorhandensein eines „Bürstensaumes“ aus kurzen, dicker erscheinenden Mikrovilli (O'Leary et al. 2019; Nevo et al. 2019). Erstmals wurde dieser Zelltyp im Trachealepithel der Ratte beschrieben. Rhodin und Dalhamn entdeckten mittels Transmissionselektronenmikroskopie einen seltenen Zelltyp, welcher eine spezielle Morphologie aufwies. Die Zellen waren flaschenförmig und wiesen apikal einen Saum aus Mikrovilli auf, welche klar von den Zilien der zilientragenden Zellen abzugrenzen war. Aufgrund ihres Bürstensaumes wurden diese Zellen als „*Brush cells*“ bezeichnet (Rhodin und Dalhamn 1956), wobei die beschriebenen Zellen nach heutigem Kenntnisstand in mindestens zwei unterschiedliche Zelltypen unterteilt werden können: die „*Brush cells*“ (SCC) und die neuroendokrinen Zellen. Beide Zelltypen weisen die von Rhodin und Dalhamn beschriebenen Charakteristika auf. Mit der damaligen Technik der Elektronenmikroskopie war eine weitere Unterscheidung der Zelltypen nicht möglich. Darauf folgend wurde dieser Zelltyp auch in anderen Organen identifiziert, jedoch von unterschiedlichen Forschergruppen und zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Diesen Umständen ist es geschuldet, dass keine einheitliche Nomenklatur für diesen Zelltyp besteht. Im Gastrointestinaltrakt werden diese Zellen als „*Tuft cells*“ bezeichnet, in der Nasenschleimhaut dagegen als SCC (Trier et al. 1987; Finger et al. 2003). In den Atemwegen werden die Zellen teilweise als „*Brush*“ oder „*Tuft cells*“ bezeichnet (Krasteva et al. 2011; Sbarbati und Osculati 2005). Unabhängig von der Lokalisation können diese Zellen aber unter dem Begriff SCC zusammengefasst werden.

### 1.4.1 Lokalisation von SCC

SCC sind in den Epithelien verschiedener Organe nachzuweisen. In der Maus können diese Zellen in dem Epithel der Nase (Finger et al. 2003), in der Konjunktiva (Wiederhold et al. 2015), in der *Tuba auditiva* (Innenohr) (Krasteva et al. 2012b), im VNO (Ogura et al. 2010), in der Trachea (Krasteva et al. 2011), in der Gingiva (Zheng et al. 2019), im Thymus (Panneck et al. 2014), in der Gallenblase (Luciano und Reale 1990), dem Magen (Liu et al. 2017), im Dün- und Dickdarm (Gebhard und Gebert 1999), in der Urethra (Deckmann et al. 2014) und der Vagina (Liu et al. 2017) beobachtet werden (Abb. 11). Unterhalb der Bifurkation der Trachea können vereinzelt SCC in den extrapulmonalen Atemwegen beobachtet werden. Ihre Anzahl nimmt bei der Maus aber proportional zum Durchmesser der Atemwege ab, sodass nur noch sehr wenige dieser Zellen in den größeren intrapulmonalen Atemwegen zu finden sind. Im Alveolargewebe der Maus können unter naiven Bedingungen dagegen keine SCC in der Maus beobachtet werden (Krasteva et al. 2011). Jedoch konnten Rane und KollegInnen zeigen, dass sich nach einer schweren Infektion mit Influenzaviren im Zuge einer epithelialen Regeneration

und Hyperplasie SCC im Alveolargewebe der Maus ausbilden (Rane et al. 2019). In der Lunge der Ratte dagegen sind SCC (*Brush cells*) schon unter Normalbedingungen sowohl im Bronchiolarepithel als auch im Alveolarepithel vorhanden (Chang et al. 1986; Luciano et al. 1969). Im Menschen konnte dieser Zelltyp bisher nur in einigen dieser Organe nachgewiesen werden, so z.B. in der Nase (Lee und Cohen 2014a), im Thymus (Miller et al. 2018; Panneck et al. 2014), im Darm (Becher Carstens et al. 1976) und in der Urethra (Deckmann et al. 2015) (Tabelle 1). In der humanen Trachea wurde von Rhodin mittels Elektronenmikroskopie ebenfalls ein Zelltyp beschrieben, welcher einen Bürstensaum aufwies (Rhodin 1959). In neueren Untersuchungen führten Plasschaert und KollegInnen Einzelzellsequenzierungen von humanen trachealen Epithelzellen durch. Diese ermöglichten es jedoch nicht, SCC von neuroendokrinen Zellen abzugrenzen. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass speziesspezifische Unterschiede bestehen und bis heute nicht geklärt werden konnte, ob SCC in der humanen Trachea einen unabhängigen Zelltyp darstellen (Plasschaert et al. 2018).



**Abbildung 11: Präsenz von SCC in der Maus.**

Tabelle 1: Lokalisation von SCC im Menschen und in der Maus.

Lokalisation	Mensch	Maus	Literatur
Nasenschleimhaut	+	+	(Finger et al. 2003; Lee und Cohen 2014a)
Gingiva	unklar	+	(Zheng et al. 2019)
Vomeronasalorgan	-	+	(Ogura et al. 2010)
Trachea	(+)	+	(Krasteva et al. 2011; RHODIN 1959)
Konjunktiva	unklar	+	(Wiederhold et al. 2015)
Tuba auditiva	unklar	+	(Krasteva et al. 2012b)
intrapulmonale Atemwege	unklar	(+)	(Liu et al. 2017)
Lungenalveolen	-	(+)	(Rane et al. 2019)
Thymus	+	+	(Panneck et al. 2014; Miller et al. 2018)
Magen	-	+	(Liu et al. 2017)
Darm	+	+	(Trier et al. 1987; Becher Carstens et al. 1976)
Pankreas	+	unklar	(Schütz et al. 2019)
Gallenblase	-	+	(Luciano und Reale 1990)
Urethra	+	+	(Deckmann et al. 2014; Deckmann et al. 2015)
Vagina	unklar	+	(Liu et al. 2017)

#### 1.4.2 Molekulare Charakteristika von SCC

Die Entstehung von SCC ist abhängig von dem Transkriptionsfaktor Skn-1a (*POU homeodomain transcription factor* = Pou2f3). Dieser wird spezifisch in bestimmten Geschmackszellen der Zunge und SCC exprimiert. Mäuse, welche eine Defizienz für diesen Transkriptionsfaktor aufweisen, entwickeln keine Geschmackszellen des Typs II in der Zunge sowie keine TRPM5-positiven Zellen in anderen Epithelien (Yamashita et al. 2017; Matsumoto et al. 2011). Dieser Mausstamm eignet sich daher besonders, um die Funktion dieser Zelltypen zu analysieren.

Zudem kann DCLK1 (*doublecortin-like kinase 1*) als Marker für SCC herangezogen werden, da diese Kinase sowohl von SCC im Gastrointestinaltrakt als auch im Respirationstrakt exprimiert wird, nicht jedoch von anderen Epithelzelltypen (Gerbe et al. 2009; Bankova et al. 2018).

Charakteristisch für SCC ist die Expression von Geschmacksrezeptoren und Komponenten der Geschmackstransduktionskaskade (GNAT3, PLC $\beta$ 2, TRPM5). Dabei nimmt TRPM5 eine Schlüsselrolle als Marker ein. Dieser Kationenkanal wird von allen SCC, unabhängig von ihrer Lokalisation exprimiert (Kaske et al. 2007; Kusumakshi et al. 2015; Tizzano et al. 2011). Die

Expression der verschiedenen TasR zwischen den einzelnen Lokalisationen dagegen ist sehr unterschiedlich. So konnte in Einzelzellsequenzierungen von SCC des Darms der Maus nur die Expression des Tas1R3 nachgewiesen werden, eine Expression von Tas2R-mRNA konnte jedoch nicht beobachtet werden (Najdsombati et al. 2018; Howitt et al. 2020), wohingegen Liu und KollegInnen in Reportermäusen, welche GFP unter dem Promotor des Tas2R143 exprimieren, GFP-positive Zellen im Colon, Jejunum und Duodenum nachweisen konnten. Diese Zellen waren ebenso DCLK1-positiv (Liu et al. 2017). Im Gegensatz dazu exprimieren die SCC im Trachealepithel eine Vielzahl von TasR. Sowohl der Tas1R3 als auch 18 der 35 in der Maus vorhandenen Tas2R konnten bisher auf mRNA-Ebene in SCC der Trachea nachgewiesen werden (Bankova et al. 2018; Krasteva et al. 2011; Liu et al. 2017; Najdsombati et al. 2018; Montoro et al. 2018).

Es lässt sich schlussfolgern, dass alle SCC unabhängig von der Lokalisation drei grundlegende Merkmale aufweisen: 1. Vorhandensein eines apikalen Bürstensaumes, 2. Abhängigkeit der Entstehung vom Transkriptionsfaktor Pou2f3 und 3. Expression von Komponenten der Geschmackstransduktionskaskade (TRPM5).

### 1.4.3 Acetylcholin in SCC

Der Neurotransmitter Acetylcholin (ACh) nimmt sowohl im zentralen als auch im peripheren Nervensystem eine zentrale Rolle als Neurotransmitter ein. So wird ACh im peripheren Nervensystem z.B. von parasympathischen Neuronen freigesetzt. In den Atemwegen führt ACh zu einer Kontraktion der glatten Muskulatur und somit zu einer Bronchokonstriktion (zusammengefasst von Kummer et al. 2008). ACh wird in der Zelle aus der Alkoholverbindung Cholin und der aktivierten Fettsäure Acetyl-CoA gebildet. Essentiell für diesen Prozess ist das Enzym Cholin-Acetyltransferase (ChAT). Das im Zytoplasma gebildete ACh akkumuliert in Neuronen, anschließend in synaptischen Vesikeln in den Neuronen wo es bis zur Freisetzung gespeichert wird. Für diesen Prozess ist der vesikuläre Acetylcholintransporter (VAChT) notwendig. Das in den Vesikeln gespeicherte ACh wird bei einer Depolarisation des Neurons über Exozytose freigesetzt und bindet an ACh-Rezeptoren, welche von der postsynaptischen Zelle, z.B. der glatten Muskelzelle, exprimiert werden (zusammengefasst von Kummer et al. 2008). Die ACh-Rezeptoren können in zwei Klassen unterteilt werden: zum einen in die nikotinischen ACh-Rezeptoren (nAChR), welche Kationenkanäle darstellen und durch Nikotin aktiviert werden können, und zum anderen in die muskarinischen ACh-Rezeptoren, welche zu der Klasse der GPCR gehören und durch Muskarin aktiviert werden können. Im Anschluss wird das ACh durch extrazelluläre Acetylcholinesterasen abgebaut und Cholin über Cholintransporter wie den CHT1 (*high affinity choline transporter 1*) wieder von der präsynaptischen Zelle aufgenommen (zusammengefasst von Picciotto et al. 2012; Kummer et al. 2008; Kummer und Krasteva-Christ 2014).

ACh wird jedoch auch von nicht-neuronalen Zellen synthetisiert. Ein prominentes Beispiel stellt dabei die Plazenta dar. In diesem nicht innervierten Organ konnte bereits 1966 von Morris das Enzym ChAT nachgewiesen werden (Morris 1966). Seitdem konnte die Maschinerie, welche für die Synthese (ChAT), Transport (VACHT) und Wiederaufnahme (CHT1) von ACh bzw. Cholin notwendig ist, in diversen Zelltypen nachgewiesen werden. Beispiele dafür sind Zellen des adaptiven (B-Zellen (Reardon et al. 2013) und T-Zellen (Rinner und Schauenstein 1993; Dhawan et al. 2016), aber auch des angeborenen Immunsystems (Makrophagen und dendritische Zellen (Reardon et al. 2013)). Ogura und KollegInnen konnten erstmals 2010 die Expression von ChAT und VACHT in SCC des VNO nachweisen (Ogura et al. 2010). In späteren Untersuchungen in der Maus konnte die Expression der ChAT ebenso in SCC der Trachea (Krasteva et al. 2011), *Tuba auditiva* (Krasteva et al. 2012b), Nasenschleimhaut (Saunders et al. 2014), Urethra (Deckmann et al. 2014), Thymus (Panneck et al. 2014), im Magen-Darm-Trakt (Magen, Gallenblase, Gallengang, Dünndarm, Dickdarm) (Schütz et al. 2015) und in der Konjunktiva (Wiederhold et al. 2015) nachgewiesen werden. Die Expression des VACHT konnte jedoch nur in den SCC des VNO sowie der Trachea nachgewiesen werden (Ogura et al. 2010; Krasteva et al. 2011). Im Magen-Darm-Trakt konnte die Expression des VACHT dagegen nicht nachgewiesen werden (Schütz et al. 2015). Die Expression der ChAT in SCC lässt vermuten, dass diese in der Lage sind, ACh zu produzieren und dieses anschließend freizusetzen. Sie werden daher auch als solitäre cholinerge chemosensorische Epithelzellen bezeichnet (SCCC).

### 1.4.4 Funktion der SCC

Die Funktionen der SCC waren lange Zeit unklar. Erstmals konnten Tizzano und seine KollegInnen 2010 in einer Studie die Funktion von SCC in der Nasenschleimhaut beschreiben. Diese reagierten auf die Bittersubstanz Denatonium und bakterielle QSM mit einem Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  und dies wiederum führte zu einer Stimulation von sensorischen Nervenfasern, welche in Kontakt zu SCC stehen. Der Neurotransmitter, welcher von SCC sezerniert wurde und die sensorischen Nervenfasern aktivierte, wurde nicht näher beschrieben oder untersucht. Dies mündete schlussendlich in einer verminderten Atemfrequenz. Dieser neuentdeckte Mechanismus wurde als Schutzreflex gewertet, welcher das Eindringen von potentiell gefährlichen Substanzen (Bitterstoffe) oder Mikroorganismen (QSM) verhindern soll (Tizzano et al. 2010).

Inzwischen hat sich das Konzept etabliert, dass SCC ihre Umgebung überwachen und durch die Freisetzung von neuromodulatorischen und immunmodulatorischen Stoffen mit benachbarten Zellen kommunizieren und so Schutzreflexe und Immunantworten hervorrufen. Die bisher nachgewiesenen Beispiele für dieses Konzept sind vielfältig und abhängig von der Lokalisation der SCC. So können SCC im Dünndarm eine Kolonisierung mit Würmern,

Einzellern und eine Verschiebung des Mikrobioms erkennen und eine Typ-2-Immunreaktion sowie eine Veränderung der Zellzusammensetzung des Epithels hervorrufen. In den Atemwegen dagegen reagieren SCC auf bakterielle Produkte, Allergene und potentiell giftige Substanzen (Bitterstoffe) und lösen Mechanismen aus, welche die weitere Aufnahme dieser Substanzen vermeiden oder bakterielles Wachstum einschränken sollen. In der Urethra erkennen SCC ebenfalls Bitterstoffe und reagieren auf uropathogene Erreger (*E. coli*), was zu einer erhöhten Kontraktion der Harnblase führt. Die Funktionen der SCC in anderen Organen, wie der Gallenblase, Colon, Konjunktiva, *Tuba auditiva* und dem Magen, bleibt jedoch ungeklärt (Billipp et al. 2021; Deckmann et al. 2014; Nadjisombati et al. 2018; Bankova et al. 2018; Moltke et al. 2016; Gerbe et al. 2009; Gerbe et al. 2016; Schneider et al. 2018; Lei et al. 2018; Tizzano et al. 2010; Ualiyeva et al. 2020).

### 1.4.4.1 Darm

Die Funktion der SCC (*Tuft cells*) ist im Dünndarm von Mäusen am detailliertesten beschrieben. In diesem Organ ist dieser Zelltyp essentiell für die Erkennung und Beseitigung einer Infektion des Darms mit Endoparasiten wie Würmern (*Heligmosomoides polygyrus*, *Trichinella spiralis*, *Nippostrongylus brasiliensis* (NB)) und Einzellern (*Tritrichomonas sp.*). Dies konnte parallel von drei verschiedenen Arbeitsgruppen initial im Jahr 2016 gezeigt werden (Gerbe et al. 2016; Howitt et al. 2016; Moltke et al. 2016). So konnten Howitt und KollegInnen nachweisen, dass Mäuse, die mit dem Wurm NB infiziert wurden und eine Defizienz für TRPM5 besitzen, eine erhöhte Anzahl an Würmern aufwiesen. Zudem erhöhte sich die Anzahl an SCC (um den Faktor ~10) sowie Becherzellen nach Infektion mit diesem Endoparasiten. Dieser Effekt war ebenfalls TRPM5-abhängig (Howitt et al. 2020). Ähnliche Ergebnisse wurden von Moltke und KollegInnen publiziert. Auch hier zeigte sich eine TRPM5-abhängige Zunahme von SCC und Becherzellen nach NB-Infektion (Moltke et al. 2016). In einer weiteren Studie von Gerbe und KollegInnen konnte zudem gezeigt werden, dass dieser Effekt SCC abhängig ist. *Pou2f3*-defiziente Mäuse, welche keine SCC besitzen, zeigten ebenfalls eine erhöhte Anzahl an Würmern nach Infektion im Vergleich zum Wildtyp auf (Gerbe et al. 2016). In allen drei Arbeiten konnte das Interleukin IL-25 in SCC nachgewiesen werden. Zudem wurde gezeigt, dass IL-25 nach Infektion mit Endoparasiten aus SCC freigesetzt wird und dies abhängig von TRPM5 sowie GNAT3 ist, beides Proteine, welche selektiv in SCC exprimiert sind. Sezerniertes IL-25 aktiviert in der Darmmukosa befindliche spezielle residente Immunzellen, sogenannte *innate lymphoid cells type II* (ILC2) (Moltke et al. 2016). Diese wiederum sezernieren im Anschluss verschiedene Interleukine, wie IL-5, 9 und 13 (zusammengefasst von Eberl et al. 2015). Insbesondere führt IL-13 zu einer Erhöhung der SCC- und Becherzell-Anzahl im Darm, indem es auf Stammzellen wirkt, wodurch sich diese in die beiden genannten Zelltypen differenzieren. Dieser Effekt kann bereits nach wenigen Tagen

*post infectionem* beobachtet werden, da Zellen des Darmepithels ständig erneuert werden (Mayhew et al. 1999). Der Effekt von IL-13 auf die SCC-Anzahl konnte sowohl *in vivo* als auch *in vitro* nachgewiesen werden. So führte die intraperitoneale Injektion von IL-25 in Mäusen sowie die Applikation von IL-13 in Darm-Organoiden zu einer Erhöhung der SCC- und Becherzell-Anzahl (Howitt et al. 2016; Moltke et al. 2016). Die neu entstandenen Becherzellen produzieren vermehrt Mukus und antimikrobielle Peptide, was wiederum zu einer Abtötung bzw. Abtransport der Endoparasiten führt (zusammengefasst von McKay et al. 2017). Der durch die Freisetzung von IL-25 aus SCC entstehende positive *Feed-forward-loop* verstärkt die ILC2-Antwort zusätzlich, indem die Anzahl der IL-25 produzierenden SCC durch IL-13 erhöht wird, was wiederum eine vermehrte IL-25 Freisetzung und somit ILC2-Aktivierung zur Folge hat. Dieser neuentdeckte Signalweg fördert so einen raschen Epithelumbau und die Befreiung des Darms von Endoparasiten (Ting und Moltke 2019) (Abb. 12).

Neben IL-25 konnten weitere Substanzen identifiziert werden, welche von SCC im Darm nach einer Infektion mit Würmern freigesetzt werden und zusätzlich zu einer Aktivierung von ILC2 führen. Bei diesen Substanzen handelt es sich um Peptido-(Cysteinyl-)Leukotriene (CysLT) (McGinty et al. 2020). Die Synthese von CysLT findet durch die Umwandlung von Arachidonsäuren über das Enzym 5-Lipoxygenase (Alox5) und in einem weiteren Schritt über die Enzyme LTA<sub>4</sub>-Hydrolase oder LTC<sub>4</sub>-Synthase (LTC<sub>4</sub>S) in die CysLT LTA<sub>4</sub> oder LTC<sub>4</sub> statt (zusammengefasst von Haeggström und Funk 2011). CysLT sind Entzündungsmediatoren und zudem Aktivatoren von ILC2 (Doherty et al. 2013; Moltke et al. 2017). Die Expression der CysLT-produzierenden Enzyme war bis vor wenigen Jahren nur in hämatopoetischen Zellen bekannt, jedoch konnten Bezençon und KollegInnen ihre Expression bereits 2008 in intestinalen SCC nachweisen (Bezençon et al. 2008). Die Expression von Alox5 konnte in einer späteren Studie zudem auch in SCC anderer Organe (Thymus, Gallenblase, Trachea) nachgewiesen werden (Nadjsombati et al. 2018). Im Dünndarm konnte gezeigt werden, dass die Zunahme der SCC und Becherzellen im Verlauf einer Infektion durch den Wurm *H. polygyrus* abhängig von der Produktion von Leukotrienen ist. So wiesen Mäuse, welche eine Defizienz für Alox5 besitzen, eine verringerte Zunahme der Anzahl dieser Zelltypen auf. Ebenso war die Anzahl der Würmer im Darm in diesen Alox5-defizienten Mäusen erhöht. Zudem konnte gezeigt werden, dass intestinale murine sowie humane SCC nach Stimulation mit Ionomycin, welches die [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> erhöht, CysLT freisetzen, und dass dieser Effekt teilweise TRPM5-abhängig ist (McGinty et al. 2020). Eine Beteiligung der Leukotriene bei der Abwehr von Einzellern (*Tritrichomonas*) wurde von McGinty und KollegInnen jedoch ausgeschlossen (McGinty et al. 2020) (Abb. 12). Die Substanzen oder die Rezeptoren, welche in der Erkennung von Würmern durch SCC verantwortlich sind, konnten bis heute jedoch noch nicht identifiziert werden (Billipp et al. 2021).

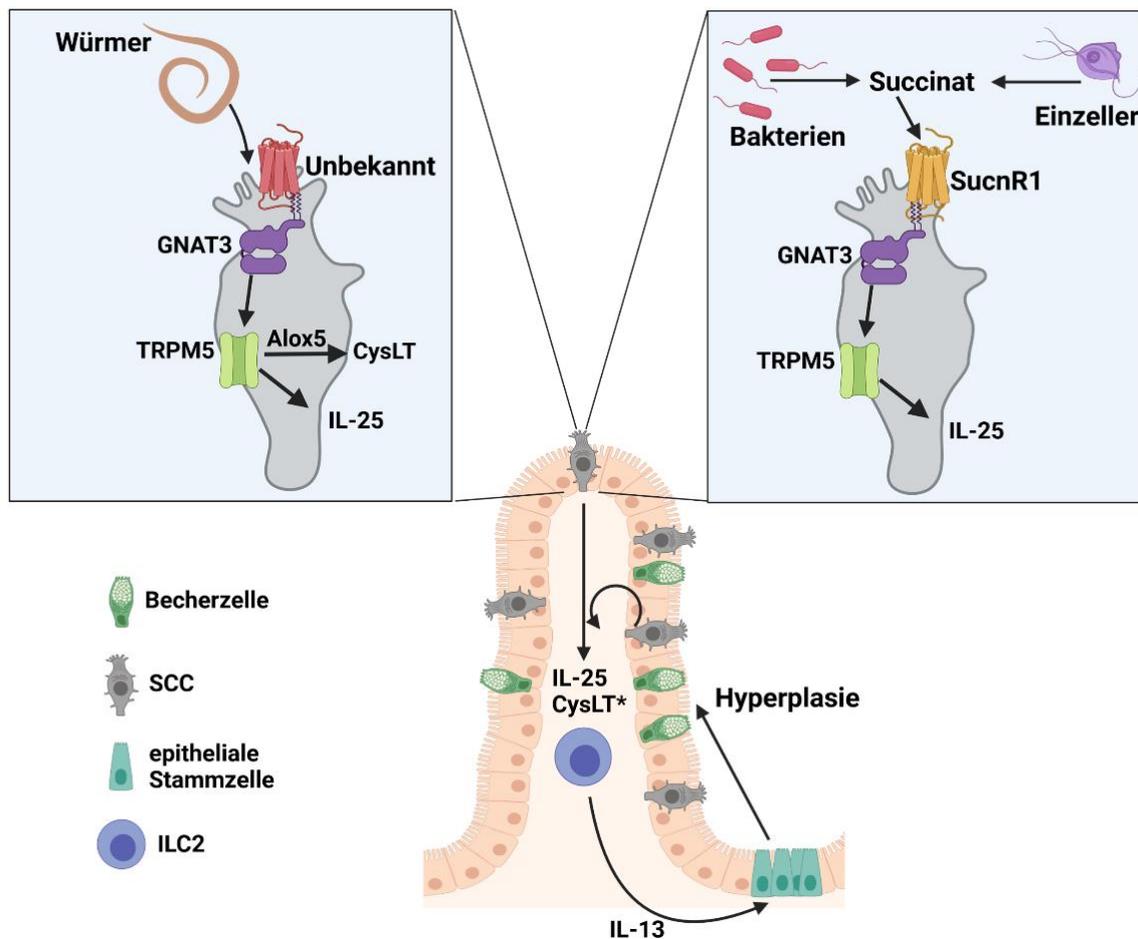
Im Gegensatz dazu konnte nachgewiesen werden, dass die Erkennung von Einzellern (*Tritrichomonas sp.*) durch SCC im Darm über den Metaboliten Succinat vermittelt ist (Lei et al. 2018; Nadsombati et al. 2018; Schneider et al. 2018). Succinat wird einerseits innerhalb des Citratzyklus gebildet, andererseits entsteht es auch bei der anaeroben Fermentation in einigen Bakterien, Einzellern und Würmern. Von diesen Organismen kann Succinat auch aktiv freigesetzt werden und ist in Kulturüberständen dieser messbar (Müller et al. 2012; Nadsombati et al. 2018; Lei et al. 2018). Als Rezeptor, welcher Succinat erkennt, wurde der GPCR 91, auch SucnR1 (Succinatrezeptor 1), genannt, identifiziert. Dieser Rezeptor wird vor allem von Zellen in der Leber, der Niere und von Immunzellen (Makrophagen, dendritische Zellen) exprimiert (Trauelsen et al. 2021; He et al. 2004; Rubic et al. 2008). Nadsombati und KollegInnen konnten die Expression dieses Rezeptors jedoch in SCC des Dünndarms, Dickdarms, Thymus und der Trachea nachweisen. In diesen Organen war die Expression von SucnR1 unter den verschiedenen Epithelzelltypen auf SCC beschränkt (Nadsombati et al. 2018). Die orale Applikation von Succinat führte zu einer Zunahme der SCC sowie der Becherzellen im Darm, welche sowohl abhängig von TRPM5 sowie von GNAT3 war (Lei et al. 2018). Zudem konnte gezeigt werden, dass es zu einer IL-25 abhängigen Rekrutierung von ILC2 nach Succinat-Applikation kam (Nadsombati et al. 2018). Mäuse, welche eine Defizienz für SucnR1 aufwiesen, zeigten diese Effekte nicht. Ebenso konnte in diesen Mäusen nach Infektion mit dem Einzeller *Tritrichomonas rainier* keine Hyperplasie der SCC und Becherzellen beobachtet werden. Im Gegensatz dazu führte die Infektion mit dem Wurm *N.B* auch in SucnR1-defizienten Mäusen zu einer Hyperplasie von SCC und Becherzellen sowie zu einer ILC2-vermittelten Immunantwort (Lei et al. 2018) (Abb. 12).

Zudem konnte gezeigt werden, dass die Applikation von Antibiotika (Streptomycin) im Ileum zu einer Verschiebung des Mikrobioms und in Folge dessen zu einer Hyperplasie von Becherzellen und SCC führte. Dieser Effekt war ebenfalls SucnR1-abhängig und somit SCC vermittelt (Lei et al. 2018).

Zusammenfassend kann geschlussfolgert werden, dass SCC an der Erkennung von Einzellern, Würmern und Verschiebungen des Mikrobioms beteiligt sind. Je nach Stimulus bzw. Erreger kommt es zu der Freisetzung von verschiedenen Molekülen wie IL-25 (Würmer, Protisten) und Leukotrienen (Würmer), diese führen zu einer Aktivierung von residenten Immunzellen (ILC2) und durch Freisetzung von weiteren Interleukinen (IL-13) zu einer Hyperplasie von Becherzellen und SCC im Epithel. Zudem konnte Succinat als Agonist für die IL-25-Freisetzung aus SCC via SucnR1 ermittelt werden (Abb. 12).

Neben den bereits beschriebenen immunmodulatorischen Funktionen von SCC im Darm konnte zudem nachgewiesen werden, dass SCC für eine Aufrechterhaltung der Epithelhomöostase wichtig sind. So konnte ein negativer *Feedback-Loop* nachgewiesen

werden, der die Freisetzung von ACh aus SCC beinhaltet. Middelhoff und KollegInnen konnten zeigen, dass ACh aus SCC an muskarinische Rezeptoren des Types 3 (M3R) bindet, welche unter anderem von Prox1-positiven endokrinen Zellen exprimiert werden. Wird die ACh-Bindung durch Inhibitoren blockiert, kommt es zu einer Expansion von SCC im Darm, welche durch endokrine Zellen vermittelt wird (Middelhoff et al. 2020). Zudem konnte gezeigt werden, dass verschiedene Darmkrebstypen aus DCLK1-positiven Zellen hervorgehen (zusammengefasst von Middelhoff et al. 2017).



**Abbildung 12: Schematische Darstellung der Erkennung von Endoparasiten durch SCC im Darm der Maus.** Endoparasiten (Würmer) werden über noch unbekannte Stoffe erkannt. Der oder die dafür notwendigen Rezeptoren sind ebenfalls noch nicht identifiziert. Im Gegensatz dazu werden Protisten (Einzeller, wie *Tritrichomonas spec.*) sowie ein bakterielles Ungleichgewicht über den freigesetzten Metaboliten Succinat erkannt. Dies bindet an den GPCR SucnR1, welcher spezifisch von SCC exprimiert wird. Im Anschluss erfolgt unabhängig von der Art des Stimulus, unter Beteiligung des G-Proteins GNAT3 und des Kationenkanals TRPM5, die Freisetzung von IL-25 aus SCC. Im Falle von Würmern erfolgt zusätzlich die Freisetzung von Leukotrienen (CysLT), welche über das Enzym 5-Lipoxygenase (Alox5) hergestellt werden (\*). Die von den SCC sezernierten Mediatoren (IL-25 und CysLT) aktivieren spezielle gewebsresidente Immunzellen, sogenannte ILC2. Diese setzen IL-13 frei, was zu einer vermehrten Ausdifferenzierung von Stammzellen in Becherzellen und SCC führt. Die Becherzellen produzieren Mukus und antimikrobielle Peptide, was zu einer Abtötung bzw. Abtransport der Endoparasiten und Bakterien führt. Die neu entstandenen SCC wiederum verstärken die IL-13 Freisetzung, es entsteht ein positiver *Feed-forward-Loop*.

### 1.4.4.2 Nase

SCC können sowohl im respiratorischen als auch im olfaktorischen Epithel der Nase der Maus nachgewiesen werden. Im olfaktorischen Epithel können SSC sowohl im VNO als auch im MOE (*main olfactory epithelium*) beobachtet werden (Kaske et al. 2007; Ogura et al. 2010).

SCC sind zahlreich am Eingang in das VNO der Maus lokalisiert. Dieser verbindet das VNO mit der Außenwelt. Ogura und KollegInnen konnten demonstrieren, dass diese Zellen (98,4% aller SCC) in engem Kontakt zu sensorischen Nervenfasern stehen, welche das Epithel durchziehen. Diese Nervenfasern ragen entweder bis an die basalen Fortsätze der SCC heran, oder umschlingen diese sogar (Ogura et al. 2010). Zudem konnte gezeigt werden, dass SCC im VNO die typischen Marker wie TRPM5 und PLC $\beta$ 2 exprimieren und zudem cholinerg sind (ChAT- und VAcHT-positiv). Isolierte SCC reagierten auf verschiedene Geruchs- und Bitterstoffe mit einem Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$ . Diese Effekte waren zudem TRPM5- und PLC $\beta$ 2-abhängig (Ogura et al. 2010). Für die Wahrnehmung der Reize im VNO ist es notwendig, dass die zu untersuchende Flüssigkeit, z.B. der Urin, welcher Pheromone enthält, in das VNO aufgenommen wird. Der Flüssigkeitstransport in das VNO wird über Pumpbewegungen der Gefäße in der Wand des Einführungsganges gewährleistet (Meredith et al. 1980). Ogura und KollegInnen konnten zeigen, dass die Aufnahme der Flüssigkeiten SCC- bzw. TRPM5- und PLC $\beta$ 2-vermittelt ist. So führte die Applikation von Bitterstoffen (Denatonium, CHX) zu einer verringerten Aufnahme der applizierten Testsubstanz. In TRPM5-defizienten Tieren oder nach pharmakologischer Inhibition der PLC $\beta$ 2 konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden. Die AutorInnen schlussfolgerten aus diesen Versuchen, dass die Aktivierung der SCC im Einführungsgang des VNO zu einer Stimulation der sensorischen Nervenfasern führt und im Anschluss der Transport der potentiell gefährlichen Substanzen in das VNO unterbunden wird. Zudem vermuteten die AutorInnen die Freisetzung von ACh aus den SCC. Experimente, die diese Theorie belegten, wurden jedoch nicht durchgeführt (Ogura et al. 2010).

SCC im respiratorischen Epithel der Nase der Maus und der Ratte exprimieren ebenfalls GNAT3 und PLC $\beta$ 2. Wie die SCC im VNO, stehen auch die SCC im respiratorischen Epithel in Kontakt zu sensorischen Nervenfasern (Finger et al. 2003; Tizzano et al. 2010; Saunders et al. 2014). In einer initialen Studie von Finger und KollegInnen konnte gezeigt werden, dass die Applikation von Bitterstoffen (Denatonium, CHX, Quinin) zu einer Aktivierung von trigeminalen sensorischen Nervenfasern in der Ratte führte und dass dies in einer Verringerung der Atemfrequenz mündete (Finger et al. 2003). In einer weiteren Studie von Tizzano und KollegInnen konnte gezeigt werden, dass isolierte SCC des respiratorischen Epithels, wie die des VNO, auf Bitterstoffe und zudem auf QSM mit einem Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  reagierten. Wie von Finger beschrieben, führte die Applikation von Bitterstoffen ebenso zu einer Verringerung der Atemfrequenz in Mäusen. Beide Effekte waren sowohl TRPM5- als auch GNAT3-abhängig

und somit vermutlich über SCC vermittelt (Tizzano et al. 2010). Die Substanz, welche von den SCC freigesetzt wird und im Anschluss die sensorischen Nervenfasern aktiviert, konnte von den AutorInnen jedoch nicht identifiziert werden.

In einer darauffolgenden Arbeit von Saunders und KollegInnen konnte gezeigt werden, dass die SCC im respiratorischen Epithel ebenfalls cholinerg sind (ChAT-positiv) (Saunders et al. 2014). Die AutorInnen postulierten, dass die Aktivierung der sensorischen Nervenfasern durch SCC neben den beschriebenen Effekten auf die Atemfrequenz ebenfalls zu einer lokalen Entzündung des Gewebes führt, welche durch die Ausschüttung von Neuropeptiden, wie SP, aus den Nervenfasern verursacht wird. Um diese Theorie zu untersuchen, wurden Mäusen Bitterstoffe intranasal verabreicht und im Anschluss untersucht, ob es zu einer Plasmaextravasation kam. Als Plasmaextravasation wird der Austritt von Blutplasma aus den Gefäßen in das umliegende Gewebe bezeichnet. Diese kommt durch eine Lückenbildung zwischen den Endothelzellen zustande, welche über das Neuropeptid SP vermittelt wird. Die Plasmaextravasation ist ein Charakteristikum der neurogenen Entzündung (Holzer 1988; Herbert und Holzer 2002). Die Experimente zeigten, dass sowohl die Applikation von Denatonium als auch von QSM zu einer TRPM5-abhängigen Plasmaextravasation führte. Diese war zudem abhängig von nAChR, welche von sensorischen Nervenfasern exprimiert werden, und der Freisetzung von SP aus diesen Nervenfasern. Diese Ergebnisse wurden durch die Applikation des generellen nAChR-Antagonisten Mecamylamin und Tachykininrezeptor 1 (TACR1)-Antagonisten L732138 erzielt (Saunders et al. 2014). Zudem konnte eine erhöhte Mastzelldegranulation nach Applikation von Denatonium und QSM im Nasenepithel beobachtet werden, welche ebenfalls TRPM5-abhängig war (Saunders et al. 2014). Die Aktivierung von Mastzellen, welche sich durch eine Ausschüttung von proinflammatorischen Mediatoren und damit einhergehende Freisetzung von Granula aus diesen darstellt, ist ein weiteres Merkmal einer neurogenen Entzündung (zusammengefasst von Galli et al. 2005).

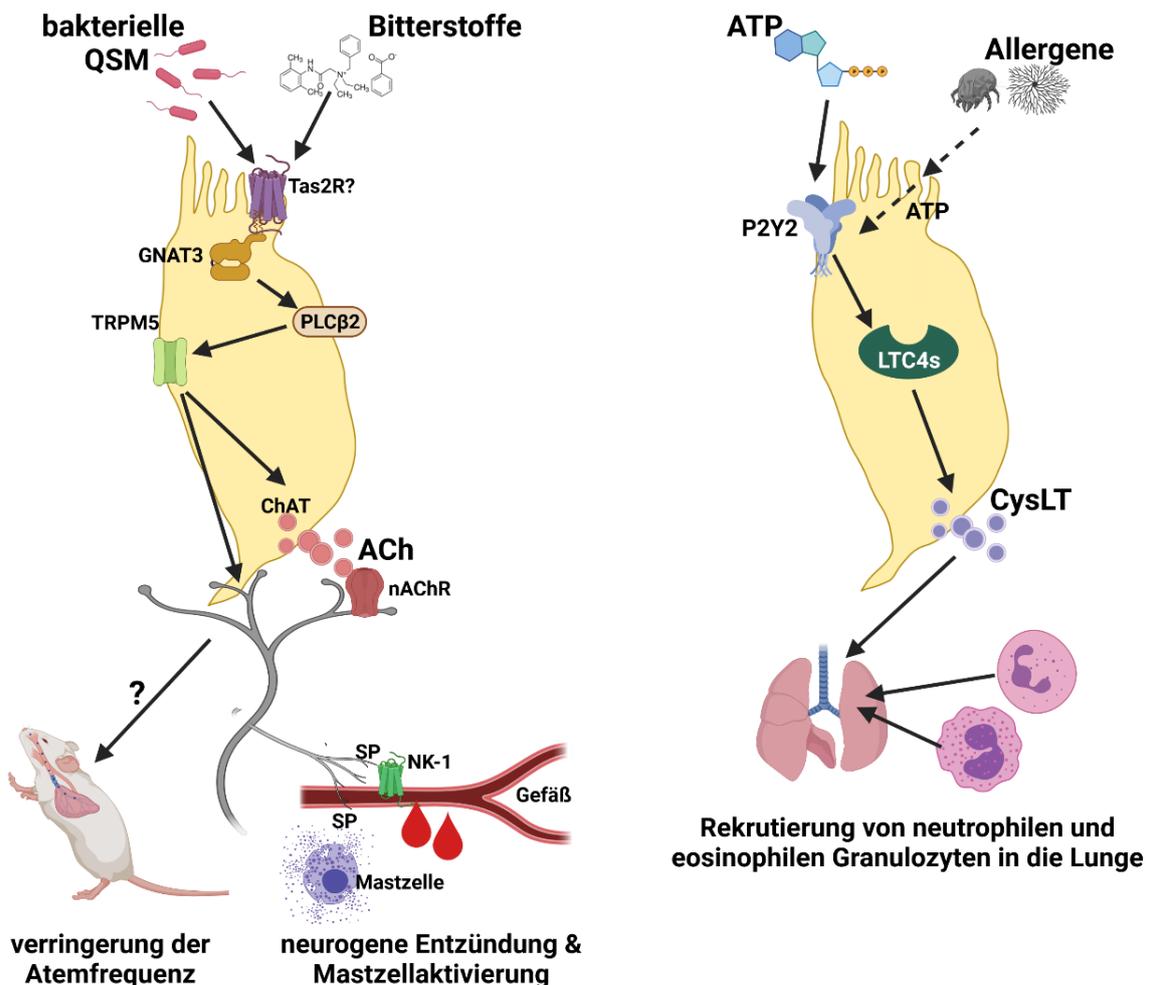
Die AutorInnen postulierten daher folgenden Signalweg: Bitterstoffe und QSM binden an noch nicht identifizierte Rezeptoren, vermutlich Tas2R, in SCC und lösen eine Signalkaskade aus, welche GNAT3 und TRPM5 involviert. Diese führt zu einer Freisetzung von ACh aus SCC, welches wiederum sensorische Nervenfasern aktiviert. Diese setzen Neuropeptide wie SP frei, was zu einer neurogenen Entzündung im Gewebe führt. Zudem führt die Freisetzung von ACh aus SCC ebenso zu der beschriebenen Reduktion der Atemfrequenz (Abb. 13).

Wie die SCC im Darm exprimieren die SCC im respiratorischen Epithel der Nase ebenfalls die Enzyme, welche nötig sind, um CysLT zu synthetisieren. Ualiyeva und KollegInnen führten Einzelsequenzierungen von Nasenepithelzellen durch und konnten anhand der Expressionsmuster und ihrer Eigenschaften in der Durchflusszytometrie zwei SCC-

Populationen voneinander abgrenzen, die des respiratorischen Epithels und die des MOE. Beide Populationen sind cholinerg (ChAT<sup>+</sup>). Die SCC des respiratorischen Epithels waren größer und wiesen eine höhere Granularität auf (FSC<sup>high</sup> und SSC<sup>high</sup>). Auffällig war die relativ hohe Anzahl der SCC im Gesamtepithel der Nase. Diese entsprach 4-5% aller Epithelzellen, wohingegen in der Trachea nur <0,5 % der Epithelzellen SCC entsprechen. Weitere Analysen zeigten jedoch, dass nur 5 % der SCC in der Nase auf die des respiratorischen Epithels entfallen, 95 % konnten dem MOE zugeordnet werden (Ualiyeva et al. 2020). Die CysLT-generierenden Enzyme und deren assoziierten Moleküle (Alox5, LTC<sub>4</sub>S und FLAP (5-LO activating protein)) konnten in beiden SCC-Populationen nachgewiesen werden und gehörten neben den klassischen Markern wie ChAT, TRPM5, GNAT3 und Pou2f3 zu den am höchsten exprimierten Genen im Vergleich zu denen in den übrigen Epithelzellen (Ualiyeva et al. 2020). Ualiyeva und KollegInnen führten an isolierten nasalen Epithelzellen Experimente durch, um zu untersuchen, ob SCC in der Lage sind CysLT freizusetzen. Es zeigte sich, dass sowohl die Applikation von Ionophor, welches zu einer Erhöhung der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> führt (Dedkova et al. 2000), als auch die Applikation von ATP und UTP in einer Freisetzung von CysLT resultierte, welche in ihrer Quantität der von Immunzellen entsprach. Die CysLT-Freisetzung durch ATP war FLAP- (für CysLT-Synthese notwendiges Protein) und P2Y2- (purinergere Rezeptor) abhängig. In *in-vivo* Experimenten konnte die P2Y2-abhängige CysLT-Freisetzung aus SCC erneut bestätigt werden. So führte die intranasale Applikation von ATP in Wildtyp-Mäusen zu einer Erhöhung der CysLT in der nasalen Lavage, jedoch nicht in SCC- oder P2Y2-defizienten Mäusen (Ualiyeva et al. 2020). Die Freisetzung von ATP in den Atemwegen erfolgt unter pathophysiologischen Bedingungen unter anderem bei allergischen Reaktionen nach Kontakt mit Schimmelpilzen (*Alternaria sp.*) (O'Grady et al. 2013).

Die AutorInnen um Ualiyeva vermuteten, dass SCC in der Lage sind, Allergene wie Schimmelpilze (*Alternaria*) und Hausstaubmilben (*Dermatophagoides pteronyssinus* (DP)) indirekt über die Freisetzung von ATP aus anderen Zellen als Antwort auf diese oder direkt über noch nicht identifizierte Rezeptoren wahrzunehmen. In isolierten nasalen SCC führte die Applikation von *Alternaria* und DP zu einer Freisetzung von CysLT. Diese war sowohl abhängig von dem CysLT-produzierenden Enzym LTC<sub>4</sub>S und dem P2Y2. In *in-vivo* Experimenten konnten diese Ergebnisse wiederholt werden. So führte die Applikation von *Alternaria* in die Nase zu einer SCC-abhängigen (Pou2f3-Ko) CysLT-Freisetzung in die nasale Lavage. Zudem konnte gezeigt werden, dass nach mehrmaliger Applikation von *Alternaria* der induzierte Influx von Granulozyten (eosinophile und neutrophile) in die Lunge in SCC-defizienten Mäusen reduziert ist (Ualiyeva et al. 2020). Aus den beschriebenen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass SCC des respiratorischen Epithels der Nase der Maus verschiedene Sensorfunktionen erfüllen. Zum einen nehmen sie gefährliche Substanzen (Bitterstoffe) oder eine bakterielle Besiedlung (QSM) wahr, was zu einer Aktivierung von sensorischen

Nervenfasern führt und in einer Erhöhung der Atemfrequenz und/oder einer neurogenen Entzündung mündet. Beide Mechanismen sollen den Körper vor einer Aufnahme von toxischen Substanzen schützen oder eine bakterielle Infektion bekämpfen. Zum anderen sind SCC an allergischen Reaktionen beteiligt, indem sie Allergene wahrnehmen können und im Anschluss Leukotriene freisetzen, welche zu einem Influx von Immunzellen in das Lungengewebe führen (Abb. 13).



**Abbildung 13: Schematische Darstellung der Funktionen der SCC im respiratorischen Nasenepithel der Maus. Linke Seite:** SCC erkennen Bitterstoffe und bakterielle QSM vermutlich über Tas2R. Im Anschluss wird die Geschmackstransduktionskaskade (GNAT3, PLCβ2, TRPM5) aktiviert. Darauf folgend wird zum einen ACh aus den SCC freigesetzt, was zu einer Aktivierung von nAChR, welche von sensorischen Nervenfasern im Epithel exprimiert werden, führt. Diese Nervenfasern setzen das Neuropeptid SP frei, welches zu einer Aktivierung von residenten Mastzellen und zu einer TACR1-vermittelten neurogenen Entzündung im Gewebe führt. In Zuge dessen tritt Blutplasma aus den Kapillaren in das umliegende Gewebe aus. Zum anderen werden die sensorischen Nervenfasern durch SCC über einen noch nicht identifizierten Transmitter, möglicherweise ebenso ACh, aktiviert, was zu einer Verringerung der Atemfrequenz führt. **Rechte Seite:** ATP löst in SCC die Freisetzung der Entzündungsmediatoren Leukotriene (CysLT) aus. Das ATP wird entweder von anderen Epithelzellen als Antwort auf Allergene freigesetzt und bindet an den purinergen Rezeptor P2Y2, welcher von SCC exprimiert wird, oder ATP kann selbst von den SCC in Antwort auf Allergene wie Hausstaubmilben oder Schimmelpilze freigesetzt werden. Die CysLT führen zu einer Rekrutierung von Granulozyten in das Lungengewebe.

### 1.4.4.3 Trachea

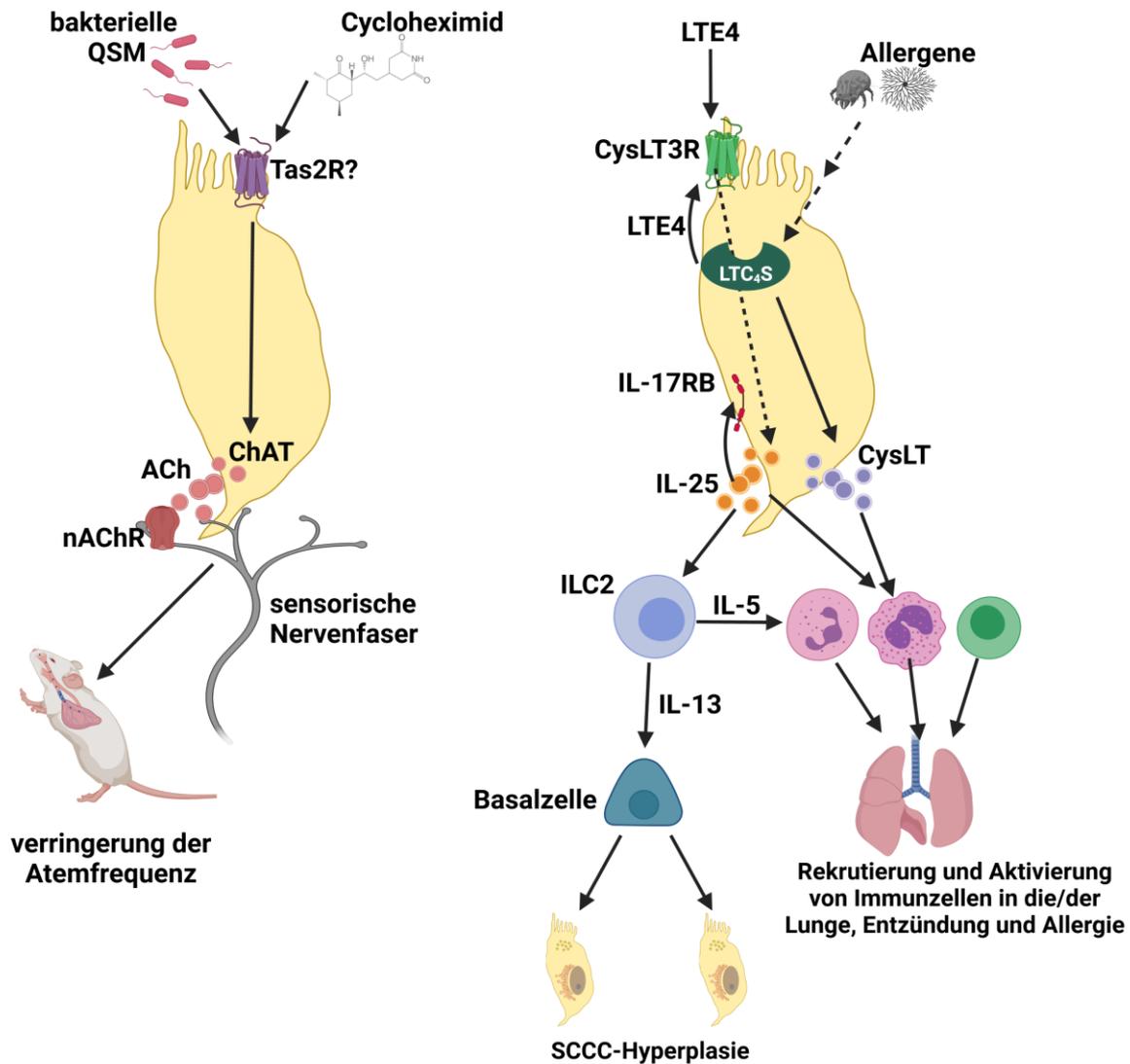
SCC im Trachealepithel der Maus exprimieren, wie die SCC der anderen Organe, die typischen Komponenten der Geschmackstransduktionskaskade (GNAT3, PLC $\beta$ 2, TRPM5) (Krasteva et al. 2011). Zudem konnten Krasteva und KollegInnen zeigen, dass SCC der Trachea cholinerg sind. So weisen Reporter-mäuse, welche GFP unter dem Promotor der ChAT exprimieren, flaschenförmige einzelne Epithelzellen auf, welche mit Antikörpern gegen GNAT und PLC $\beta$ 2 ebenfalls markiert werden. ChAT-eGFP-positive Zellen konnten ebenfalls mit Antikörpern gegen VACHT markiert werden (Krasteva et al. 2011). Im folgendem werden tracheale SCC daher als SCCC bezeichnet. Wie im Epithel der Nase, stehen SCCC in der Trachea ebenfalls in Kontakt mit sensorischen Nervenfasern, jedoch nur zu einem geringeren Prozentsatz von ~22 % (Krasteva et al. 2011). Um zu untersuchen, ob die Aktivierung der SCCC in der Trachea ähnlich wie die der Nasenschleimhaut einen Einfluss auf die Atemfrequenz der Maus hat, wurde der Tas2R105-Agonist CHX intratracheal verabreicht und die Atemfrequenz aufgezeichnet. Die Expression des Tas2R105 wurde zuvor mittels RT-PCR in isolierten trachealen SCCC validiert. Die Applikation von CHX führte zu einer Abnahme der Atemfrequenz. Diese konnte durch die vorherige Applikation von Mecamylamin verhindert werden. Zudem verhinderte die mechanische Entfernung des Trachealepithels ebenfalls die Abnahme der Atemfrequenz durch CHX. Dagegen blieb die Veränderung dieser durch Capsaicin, welches die sensorischen Nervenfasern direkt aktiviert, unbeeinflusst (Krasteva et al. 2011). In einer nachfolgenden Studie konnten die AutorInnen die gleichen Ergebnisse beobachten, wenn das QSM 3-OxoC<sub>12</sub>-HSL (HSL = homoserin Lacton) als Stimulus verwendet wurde (Krasteva et al. 2012a). Aus diesen Versuchen schlussfolgerten die AutorInnen, dass SCCC der Trachea, ähnlich wie die SCC des Nasenepithels, Bitterstoffe und bakterielle Substanzen wahrnehmen und Schutzreflexe auslösen, welche das weitere Einatmen der potentiell gefährlichen Substanzen verhindern sollen (Krasteva et al. 2011; Krasteva et al. 2012a) (Abb. 14). Eine Überprüfung dieser Hypothese durch die Verwendung von gendefizienten Mäusen wie TRPM5-Ko oder PLC $\beta$ 2-Ko konnte zum damaligen Zeitpunkt noch nicht durchgeführt werden, da die entsprechenden Tiermodelle noch nicht vorhanden waren. Ob es durch die Aktivierung der trachealen SCCC ebenfalls zu einer neurogenen Entzündung kommt, wurde noch nicht untersucht.

In einer neueren Studie von Bankova und KollegInnen konnten die AutorInnen zeigen, dass SCCC der Trachea ebenfalls IL-25 exprimieren. In IL-25-Reporter-mäusen, welche das rot fluoreszierende Protein (RFP) unter dem Promotor von IL-25 exprimieren, waren 93 % aller RFP-positiven Zellen ebenfalls mit Antikörpern gegen DCLK1 markiert und somit SCCC (Bankova et al. 2018). Durchgeführte RNA-Sequenzierungen von ChAT-GFP-positiven trachealen SCCC zeigten zudem, dass diese Zellen, ähnlich wie im Darm, die Enzyme und

deren assoziierten Proteine exprimieren, welche für die CysLT-Synthese notwendig sind (Alox5, Alox5ap (FLAP), LTC<sub>4</sub>S). Die Expression von IL-25 in SCCC konnte ebenfalls auf mRNA-Ebene bestätigt werden, zudem auch die des IL-25 bindenden Rezeptors IL-17rb (Bankova et al. 2018).

Die AutorInnen konnten zeigen, dass die Applikation von typischen Atemwegsallergenen wie dem Schimmelpilz *Alternaria* und der Hausstaubmilbe DP zu einer Zunahme der SCCC im Trachealepithel führte und dass diese abhängig von der Freisetzung von CysLT war. So konnte keine Zunahme in LTC<sub>4</sub>S-defizienten Mäusen beobachtet werden. Dagegen führte die *in vivo* Applikation von LTE4 zu einer Zunahme von SCCC. Die AutorInnen konnten zudem den Rezeptor identifizieren, an welchen LTE4 bindet. Der CysLT3R wird spezifisch von SCCC im Epithel exprimiert und nach Applikation der Allergene konnte eine erhöhte Expression dessen beobachtet werden (Bankova et al. 2018). Die AutorInnen postulierten, dass die CysLT nach Allergen-Applikation entweder direkt von den SCCC oder von anderen Immunzellen, wie Mastzellen oder dendritischen Zellen, freigesetzt werden (Bankova et al. 2018). Im Anschluss kommt es zu einer IL-25-Freisetzung aus den SCCC, welches zum einen von residenten ILC2 gebunden wird, welche im Anschluss IL-13 freisetzen und so die SCCC-Anzahl, ähnlich wie im Darm beschrieben, durch die Ausdifferenzierung von Stammzellen erhöhen. Es kommt zudem vermutlich auch zu einer Bindung von IL-25 an den IL-17rb Rezeptor, welcher von den SCCC selbst exprimiert wird. Diese Theorie wird durch die von Bankova und KollegInnen durchgeführten Versuche bestätigt, in denen Stat6-defiziente Mäuse verwendet wurden. Stat6 ist im Darm notwendig, damit die intestinalen Stammzellen nach IL-13-Stimulation in SCCC ausdifferenzieren (Howitt et al. 2016; Gerbe et al. 2016; Moltke et al. 2016). In diesen Mäusen kam es nach Applikation von LTE4 ebenfalls zu einer Zunahme der SCCC-Anzahl, jedoch nicht in Mäusen, welche eine Defizienz für den CysLT3R aufwiesen (Abb. 14).

CysLT lösen in der Lunge eine Bronchokonstriktion und eine Aktivierung und Einwanderung von residenten oder zirkulierenden Immunzellen aus, welche wiederum Zytokine und Chemokine freisetzen. Daher sind CysLT maßgeblich an der Entstehung von Asthma und Typ2-Entzündungen beteiligt (Manning et al. 1990; Leff et al. 1998; Lazarinis et al. 2018). Dementsprechend führte die Applikation von LTE4 in Mäusen zu einer Infiltration von Immunzellen (eosinophile Granulozyten, ILC2, T-Zellen). Interessanterweise war diese in CysLT3R-defizienten Mäusen reduziert. Zusätzlich führte die Gabe eines IL-25-blockenden Antikörpers ebenfalls zu einer Reduktion der Immunzellinfiltration in die Lunge. Die gleichen Ergebnisse konnten nach Applikation von *Alternaria* beobachtet werden (Bankova et al. 2018) (Abb. 14).



**Abbildung 14: Schematische Darstellung der Funktionen der SCC im Trachealepithel der Maus.** Linke Seite: SCC erkennen Bitterstoffe und bakterielle QSM, vermutlich über Tas2R. Aus den SCC wird im Anschluss ACh freigesetzt, welches an nAChR bindet, die von sensorischen Nervenfasern exprimiert werden. Die Aktivierung dieser Nervenfasern führt zu einer Verringerung der Atemfrequenz und soll dadurch das weitere Vordringen der potentiell gefährlichen Substanzen in die Lunge unterbinden. Rechte Seite: Durch Allergene freigesetzte CysLT werden über den CysLT3R von SCC wahrgenommen. Möglicherweise werden Allergene auch direkt über SCC detektiert und CysLT durch SCC produziert und sezerniert. Diese führen zu einem Influx und zu einer Aktivierung von Immunzellen (Granulozyten und T-Zellen) in die/der Lunge, was zu einer Entzündung bzw. allergischem Geschehen führt. Von den SCC wird ebenso IL-25 sezerniert. Dies führt zu einer Aktivierung von ILC2, welche wiederum andere Interleukine freisetzen (IL-13, IL-5). IL-13 führt, wie im Darm, zu einer SCC-Hyperplasie, indem es Basalzellen zur Ausdifferenzierung anregt. IL-5 aktiviert eosinophile Granulozyten in der Lunge.

Die Versuche aus dieser Studie legen nahe, dass SCC in der Trachea Allergene über freigesetzte CysLT wahrnehmen oder aktiv CysLT freisetzen. Es kommt im Anschluss zu einer Sezernierung von IL-25 durch SCC, was zu einer Aktivierung und Rekrutierung von Immunzellen in die bzw. in der Lunge führt und somit entzündliche und allergische Prozesse, ähnlich wie bereits in der Nasenschleimhaut beschrieben, auslöst.

## **1.5 Zielsetzung dieser Arbeit**

SCCC sind an allen möglichen Eintrittspforten für potentiell gefährliche Stoffe und Mikroorganismen lokalisiert. An diesen Lokalisationen üben sie eine Wächterfunktion aus und leiten Abwehrmechanismen ein, welche das Eindringen und die Vermehrung von Mikroorganismen im Organismus unterbinden sollen. Bisher konnte gezeigt werden, dass tracheale SCCC in der Lage sind, verschiedene Effektormoleküle wie ACh, IL-25 und CysLT freizusetzen (Krasteva et al. 2011; Bankova et al. 2018). Diese Moleküle führen zu lokalen Reaktionen, wie der Aktivierung von residenten Immunzellen oder der Beeinflussung der Atemfrequenz über die Aktivierung von sensorischen Nervenfasern. Diese Effektormoleküle übernehmen jedoch auch andere Funktionen im Organismus. So ist ACh ein starker Aktivator des Zilienschlages (Klein et al. 2009). Der Zilienschlag wiederum ist eine Hauptkomponente der MC, welche einen wichtigen angeborenen Schutzmechanismus der Atemwege darstellt.

Ziel dieser Arbeit war es zu prüfen, ob tracheale SCCC von Bakterien freigesetzte Substanzen wahrnehmen können und daraufhin ACh sezernieren, welches die MC beeinflusst. Zudem sollte geprüft werden, ob die mikrobielle Besiedlung der Maus einen Einfluss auf die Entstehung bzw. die postnatale Entwicklung der trachealen SCCC aufweist, oder ob ein Fehlen oder eine Funktionsunfähigkeit der SCCC die mikrobielle Besiedlung der Atemwege und Lunge beeinflusst. Um diese Arbeitshypothesen zu überprüfen, wurden sechs konkrete Fragestellungen bearbeitet.

- I. Wann entstehen tracheale SCC und ist die Entstehung abhängig vom Vorhandensein eines lebenden Mikrobioms?**
- II. Gibt es neben den bekannten Aktivatoren der MC auch andere bakterielle Stoffe, welche diese beeinflussen?**
- III. Sind SCC an der Erkennung dieser neu identifizierten Stoffe beteiligt?**
- IV. Sind SCCC in der Lage, ACh aktiv zu sezernieren, und wird durch die neu identifizierten Liganden ACh aus SCCC freigesetzt, welches den Zilienschlag beeinflusst?**
- V. Führt die Applikation von TasR-Liganden ebenfalls zu einer Stimulation und anschließender ACh-Sekretion aus SCCC?**
- VI. Hat die Unterbrechung der Geschmackstransduktionskaskade oder das Fehlen der trachealen SCCC einen Einfluss auf die bakterielle Besiedlung der Trachea und/oder der Lunge?**

Um diese Fragestellungen zu bearbeiten, wurden insgesamt 26 verschiedene Mausstämme verwendet, darunter Reporter-mäuse, welche es ermöglichten, die SCCC genauer zu charakterisieren und zu quantifizieren, Mäuse welche gnotobiotisch gehalten oder in denen Komponenten des TLR-Signalweges deletiert wurden, Mausstämme, in denen Komponenten der Geschmackstransduktionskaskade deletiert wurden, Mausstämme in denen SCCC nicht vorhanden sind, entweder durch aktive Ablation oder durch Deletion eines Transkriptionsfaktors, und zudem Mausstämme, in denen zelltypspezifisch das ACh-produzierende Enzym ablatiert oder unter dessen Promotor ein lichtsensitiver Kanal exprimiert wurde.

Diese Mausstämme wurden für immunhistochemische Färbungen, Messungen der Partikeltransportgeschwindigkeit (PTS), Messungen der Zilienschlagfrequenz, Messung der  $[Ca^{2+}]_i$  von isolierten Neuronen, ACh-Konzentrationsbestimmungen mittels HPLC, optogenetische Experimente, PCR-Analysen, bakteriologische Untersuchungen und Infektionsexperimente mit *S. pneumoniae* verwendet.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Materialien und Geräte

#### 2.1.1 Chemikalien, Medien und Reagenzien

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Medien und Reagenzien sind in der Tab. 2 aufgeführt. Alle Chemikalien, sofern nicht extra aufgeführt, wurden in der höchst möglichen Reinheitsstufe bezogen und stets nach Angaben des Herstellers angesetzt und aufbewahrt.

**Tabelle 2: Verwendete Chemikalien, Medien und Reagenzien.**

Chemikalie/Reagenz	Quelle	Bestellnummer	Verwendung
<b>2-Methylbutan</b>	Carl Roth	3927.1	Kryokonservierung von Gewebe
<b>5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-<math>\beta</math>-D-galactopyranoside (X-Gal)</b>	Sigma-Aldrich	B4252	X-Gal Färbung
<b>10x DNase I Reaction Puffer</b>	Invitrogen	10640226	cDNA-Synthese
<b>10x Reverse Transkriptase Puffer</b>	Invitrogen	18080093	cDNA-Synthese
<b>AmpliAq Gold</b>	Applied Biosystems	N8080247	PCR
<b>Aceton</b>	Merck Millipore	100014	Beschichtung von Deckgläschen
<b>Agarose LE</b>	Biozym	840004	Gelelektrophorese
<b>Blut-Agar-Platten</b>	Oxoid	CM0055	Anzucht von <i>B. pseudohinzii</i>
<b>Calciumchloridhydrat (CaCl<sub>2</sub> 2 H<sub>2</sub>O)</b>	Merck	102382	Puffer-Herstellung
<b>Citronensäure (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>·H<sub>2</sub>O)</b>	Roth	P280	Puffer-Herstellung
<b>Columbia-Blutagarplatten mit 5 % Schafsblut</b>	BD Biosciences	PA-254005.06	Kultivierung von <i>S. pneumoniae</i>
<b>DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol)</b>	Sigma-Aldrich	D9542	Immunfluoreszenz
<b>D-Glucose</b>	Sigma-Aldrich	G8270	Puffer-Herstellung
<b>Dispase II</b>	Roche	4942078001	Isolation von Epithelzellen

## 2. Material und Methoden

<b>Dimethylformamid</b>	Sigma-Aldrich	PHR1553	X-Gal Färbung
<b>DMSO (Dimethylsulfoxid)</b>	Sigma-Aldrich	472301	Lösungsmittel
<b>DNA-Marker (100 bp DNA Ladder)</b>	Invitrogen	15628050	Gelelektrophorese
<b>DNeasy® Blood &amp; Tissue</b>	QIAGEN	69506	DNA-Isolation
<b>DNase I</b>	Invitrogen, Carlsbad, USA	AM2222	Reverse Transkription
<b>dNTP Set</b>	QIAGEN	201900	PCR
<b>Dynabeads</b>	Invitrogen	10003D	PTS-Messungen
<b>EDTA 0,5 M</b>	Thermo Fischer	AM9260G	Gelelektrophorese
<b>EDTA-Microvetten</b>	Sarstedt	120823	Blutentnahme
<b>Eisessig (Essigsäure)</b>	Carl Roth	HN55.4	Gelelektrophorese
<b>Eserin (Physostigminsalicylat)</b>	Sigma-Aldrich	P1600000	ACh-Messungen
<b>Ethanol</b>	Carl Roth	0911.1	Immunhistochemie
<b>Ethidiumbromide</b>	Sigma-Aldrich	E1510	Gelelektrophorese
<b>FACS-Running buffer</b>	Miltenyi biotec	130-091-221	FACS-Experimente
<b>FCS (Fetales Kälberserum)</b>	Thermo Fischer	10500064	Zellkultur
<b>Flüssigstickstoff</b>	Linde	Keine Angabe	Kryokonservierung von Gewebe
<b>Fura-2-AM</b>	Thermo Fischer Scientific	F1221	Ca <sup>2+</sup> -Messungen
<b>GF-1 Blood Total RNA Extraction Kit</b>	Vivantes technologies	GF-TB-025	RNA-Isolation aus Vollblut
<b>Glycerin</b>	Merck	1370281000	Immunfluoreszenz
<b>HAMs F12-K Medium (Kaighn)</b>	Thermo Fischer	21127022	Kultivierung von M3- Reporterzellen
<b>HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution)</b>	Thermo Fischer	88284	Isolation von Epithelzellen
<b>HEPES ( 2-ethansulfonsäure)</b>	Sigma-Aldrich	H3375	Puffer-Herstellung
<b>Isofluran</b>	Baxter	Keine Angabe	Narkose
<b>K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub></b>	Sigma-Aldrich	702587	X-Gal-Färbung

<b>K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub></b>	Sigma-Aldrich	455989	X-Gal-Färbung
<b>Kochsalzlösung isotonisch</b>	Fresenius	1313121	Narkose
<b>Kollagenase A</b>	Sigma-Aldrich	10103578001	Dissoziation von Neuronen
<b>Ketamin</b>	Pfizer	Keine Angabe	Narkose Infektionsversuche
<b>Laminin</b>	Thermo Fischer Scientific	23017015	Beschichtung von Deckgläsern
<b>Leupeptin</b>	Sigma Aldrich	62070	Isolation von Epithelzellen
<b>L-Cysteine</b>	Sigma Aldrich	14495	Isolation von Epithelzellen
<b>L-Glutamic acid monosodium salt monohydrate</b>	Sigma Aldrich	49621	Kultivierung von M3-Reporterzellen und Neuronen
<b>L-15 Medium</b>	Thermo Fisher	11415056	Kultivierung von Neuronen
<b>MACSQuant Running Buffer</b>	Miltenyi Biotec	130-092-747	FACS
<b>Magnesiumchlorid</b>	Carl Roth	KK36.1	Puffer-Herstellung
<b>MEM Non-Essential Amino Acids Solution</b>	Thermo Fisher	11140050	Kultur von M3-Reporterzellen und Neuronen
<b>Mowiol</b>	Carl Roth	0713.1	Eindeckmedium
<b>Natriumcarbonat (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)</b>	Merck	106392	Puffer-Herstellung
<b>Natriumchlorid</b>	Carl Roth	3957.1	Puffer-Herstellung
<b>Natriumdihydrogenphosphatdihydrat (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O)</b>	Carl Roth	2370.1	Puffer-Herstellung
<b>Natriumhydrogencarbonat (NaHCO<sub>3</sub>)</b>	Merck	1063291000	Puffer-Herstellung
<b>Natriumphosphat monobasisch Monohydrat (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O)</b>	Sigma-Aldrich	S9638-25G	Locke-Puffer
<b>Natrium-deoxycholat</b>	Sigma-Aldrich	30970	X-Gal-Färbung
<b>Natronlauge</b>	Merck	109137	Puffer-Herstellung
<b>NP-40</b>	Merck	NP40S	X-Gal-Färbung
<b>Oligo(dT) 20-Primer</b>	Invitrogen	11685581	PCR

2. Material und Methoden

<b>Papain</b>	Sigma-Aldrich	P4762	Isolation von Epithelzellen
<b>PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung)</b>	Thermo Fischer Scientific	10010023	Zellkultur
<b>Penicillin-Streptomycin</b>	Sigma-Aldrich	P4333	Antibiotikum für Zellkultur
<b>PFA (Paraformaldehyd)</b>	Merck	1040051000	Fixierung von Gewebe
<b>Pferdeserum</b>	PAA Laboratories	B15-124	Immunfluoreszenz (Whole-Mount)
<b>Pikrinsäure (Trinitrophenol)</b>	Merck	8208950100	Fixierung von Gewebe
<b>Poly-L-Lysin</b>	Sigma-Aldrich	P4707	Beschichtung von Deckgläschen
<b>Propidium Iodid</b>	Tonbo Biosciences	13-6990-T200	Zellfärbung FACS
<b>Random Hexamers</b>	Invitrogen	N8080127	cDNA-Synthese
<b>RNeasy Mini Kit</b>	QIAGEN	74104	RNA-Extraktion
<b>Salzsäure</b>	Merck	1101652500	Puffer-Herstellung
<b>SuperScriptIII CellsDirect cDNA Synthesis System</b>	Invitrogen	#18080-200	RT-PCR - FACS Proben
<b>SuperScriptII cDNA Synthesis System</b>	Invitrogen	18064022	RT-PCR
<b>Sylgard</b>	DOW	1673921	PTS-Messungen
<b>TaKaRa Ex Taq Polymerase</b>	TaKaRa	RR001A	Genotypisierung
<b>Thilo Tears SE Augengel</b>	Alcon	bestellt bei Apotheke	Narkose
<b>Tissue-Tek-O.C.T.-Compound</b>	Sakura Finetek	4583	Kryokonservierung von Gewebe
<b>TRIS (Tris(hydroxymethyl)aminomethan)</b>	Carl Roth	4855.2	Gelelektrophorese
<b>Trypsin</b>	Sigma Aldrich	T3924	Zellkultur
<b>Tween 20 (Polyoxyethylen-Sorbitan Monolaurat)</b>	Sigma Aldrich	93774	Immunfluoreszenz
<b>Wasser für Injektionszwecke, AMPUWA</b>	Fresenius	B23067A	Beschichtung von Deckgläschen

<b>β-Mercaptoethanol</b>	Sigma-Aldrich	M6250	RNA-Isolation
<b>X-Gal</b>	Roche	XGAL-RO	X-Gal-Färbung
<b>Xylazin</b>	Bayer vital	keine Angabe	Narkose Infektionsversuche

### 2.1.2 Pharmaka

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Pharmaka können der Tab. 3 entnommen werden. Ebenso sind die Bezugsquelle, Bestellnummer, verwendetes Lösungsmittel und die Konzentrationen in denen die Pharmaka angewandt wurden, aufgeführt. Die Pharmaka wurden anhand der Angaben der Hersteller gelöst und bis zur Verwendung gelagert. Falls nötig, fand eine Lösung der Pharmaka unter Verwendung eines Ultraschallbades statt.

**Tabelle 3: Verwendete Pharmaka und Narkotika.**

<b>Pharmaka</b>	<b>Quelle</b>	<b>Bestellnummer</b>	<b>Lösungsmittel</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Verwendung</b>
<b>2-Propyl thietane (2-PT)</b>	AKos Consulting	AKOS023 876051	DMSO	1 mM	PTS-Messungen
<b>4-DAMP (1,1-dimethyl-4-diphenylacetoxypiperidinium iodide)</b>	Sigma Aldrich	SML0255	DMSO	1 µM	PTS-Messungen
<b>5-Propyl-2-thiouracil (5-PTU)</b>	Sigma Aldrich	P0643	Hepes-Puffer	1 mM	PTS-Messungen
<b>6-Propyl-2-thiouracil (6-PTU)</b>	Sigma Aldrich	P3755	Hepes-Puffer	1 mM	PTS-Messungen
<b>Acetylcholin chloride</b>	Sigma-Aldrich	A6625	Puffer	Femto-micromolar	Ca <sup>2+</sup> -Messungen
<b>Allylisothiocyanat</b>	Sigma-Aldrich	36682	DMSO	30 und 300 µM	PTS-Messungen
<b>Arbutin</b>	Sigma Aldrich	A4256	Hepes-Puffer	3-300 mM	PTS-Messungen
<b>ATP (Adenosintriphosphat)</b>	Sigma-Aldrich	A7699	Hepes-Puffer	100 µM	PTS-Messungen
<b>Atropin (Sulfatsalz-anhydrat)</b>	Sigma-Aldrich	A0257	Puffer	1 µM	PTS-Messungen, Ca <sup>2+</sup> -Messungen

2. Material und Methoden

<b>Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP)</b>	Sigma-Aldrich	C0292	Hepes-Puffer	10 nM-10 µM	PTS-Messungen
<b>Capsaicin</b>	Sigma-Aldrich	211275	Hepes-Puffer, Locke-Puffer	300 nM u. 10-100 µM (PTS)	PTS-, Ca <sup>2+</sup> -Messungen
<b>Cycloheximid</b>	Sigma Aldrich	C7698	Hepes-Puffer	100 µM	PTS-Messungen
<b>Cyclosporin H</b>	Santa Cruz	Sc-203013	Peptid-Puffer	1 µM	PTS-Messungen
<b>Denatonium benzoat</b>	Sigma Aldrich	D5765	Hepes-Puffer	0,5 – 10 mM	PTS-Messungen
<b>Glutamic Acid (Glutamat)</b>	Sigma Aldrich	49621	Hepes-Puffer	50-250 mM	PTS-Messungen
<b>L-NAME (N5-[imino (nitroamino)methyl]-L-ornithine, methyl-ester, mono-hydrochloride)</b>	Sigma-Aldrich	N5751	Hepes-Puffer	20 µM	PTS-Messungen
<b>Mecamylamin</b>	Sigma Aldrich	M-9020	Hepes-Puffer	100 µM	PTS-Messungen
<b>Muscarinchlorid</b>	Sigma Aldrich	M104	Hepes-Puffer	10 µM	PTS-Messungen
<b>N-(b-Ketocaproyl)-L-homoserine lactone (3-O-C6-(L)-HSL)</b>	Cayman CHEMICAL	10011207	Hepes-Puffer	1-100 µM	PTS-Messungen
<b>N-(3-Oxo-canoyl)-L-homoserine lactone (3-Oxo-C12-HSL)</b>	Sigma-Aldrich	O9139	Hepes-Puffer	100 µM	PTS-Messungen
<b>Phenylbutazone</b>	Sigma Aldrich	P8386	Hepes-Puffer	1 µM	PTS-Messungen
<b>Quinine</b>	Sigma Aldrich	145904	DMSO	10 µM	PTS-Messungen
<b>RP 67580</b>	Tocris Biosci.	1635	Hepes-Puffer	10 µM	PTS-Messungen
<b>[Sar<sup>9</sup>, Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]-Substance P</b>	Sigma-Aldrich	S3672	Hepes-Puffer	10 mM	PTS-Messungen
<b>Sucralose</b>	Sigma Aldrich	69293	Hepes-Puffer	3 mM	PTS-Messungen

<b>Saccharose</b>	Sigma Aldrich	84097	Hepes-Puffer	10 mM	PTS-Messungen
<b>Tetrodotoxin (TTX)</b>	Abcam	Ab120055	Hepes-Puffer	1 µM	PTS-Messungen
<b>tBoc2</b>	Bachem	4003823	Peptid-Puffer	10 µM	PTS-Messungen

### 2.1.3 Peptide

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Peptide sind in der Tab. 4 aufgeführt. Die Peptide wurden im lyophilisiertem Zustand geliefert und anschließend in C1-Puffer resuspendiert, dessen Zusammensetzung der Tab. 4 zu entnehmen ist. Die Peptide wurden in einer Konzentration von 1 mM als Stocklösung angesetzt und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

**Tabelle 4: Verwendete Peptide, deren Bezugsquelle und von dem Hersteller angegebene Reinheit.** \*gleiches Peptid von einer anderen Firma bestellt, als Kontrolle.

<b>Peptidsequenz</b> (Einbuchstaben-Aminosäurecode)	<b>Quelle</b>	<b>Reinheit</b>
<b>f-MKKFRW</b>	United Peptides	>97,34%
<b>f-MKKFRW*</b>	VCPBIO	95,04%
<b>MKKFRW</b>	United BioSystems	95,63%
<b>MGFFIS</b>	United BioSystems	95,49%
<b>WKYMVm-NH2</b>	Innovagen	>95%
<b>MMHWAm-NH2</b>	GenScript Corporation	99,6%
<b>f-MKKFNI</b>	United peptides	96,50%
<b>f-MLFYLA</b>	VCPBIO	97,04%
<b>f-MVMKFK</b>	VCPBIO	95,74%
<b>f-MGFFIS</b>	VCPBIO	95,43%
<b>f-MLFKYS</b>	VCPBIO	97,04%
<b>f-MPKLNR</b>	United BioSystems	95,32%

<b>f-MKKFLL</b>	VCPBIO	95,96%
<b>f-MKKFYS</b>	VCPBIO	97,18%
<b>f-MNKKLL</b>	United BioSystems	95,21%
<b>f-MKKNLV</b>	United BioSystems	95,67%
<b>f-MKKIML</b>	United BioSystems	95,27%
<b>f-MKKYKRLLL</b>	VCPBIO	98,87%
<b>f-MKKISKFLP</b>	VCPBIO	95,12%
<b>f-MLNKKKRGN</b>	VCPBIO	95,22%
<b>f-MKKTLSLKN</b>	VCPBIO	96,64%
<b>f-MKKFRWV</b>	VCPBIO	95,03%
<b>f-MKKFRWV</b>	Synpeptide	>95%
<b>f-MKKFRWVVL</b>	Synpeptide	>95%
<b>f-MKNFKG</b>	Synpeptide	>95%
<b>f-MKKFR</b>	VCPBIO	>96,40%
<b>f-MKKFRY</b>	VCPBIO	>96,41%
<b>f-MKKFKWSI</b>	Synpeptide	>98,14%
<b>f-MKKWRW</b>	VCPBIO	>97,62%
<b>f-MKKHRW</b>	VCPBIO	>95,44%
<b>f-MKKRFVWII</b>	Synpeptide	>95%

## 2.1.4 Geräte

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Geräte sind in der Tab. 5 aufgeführt.

**Tabelle 5: Verwendete Geräte, deren Hersteller und Verwendungszweck.**

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Verwendung</b>
<b>Delta-T-Dish und Stage Adapter</b>	Biotechs	PTS-, CBF-Messungen, Ca <sup>2+</sup> -Messungen
<b>Delta-T-Dish Stage heater</b>	Biotechs	PTS-, CBF-Messungen, Ca <sup>2+</sup> -Messungen
<b>Einbettautomat TP 1020</b>	Leica	Paraffineinbettung
<b>FACS Aria III Cell Sorter</b>	BD bioscience	FACS-Experimente
<b>Fluoreszenzmikroskop Zeiss Axioplan 2</b>	Zeiss	Fluoreszenzmikroskopie
<b>Fluoreszenzmikroskop Leica DM5000B</b>	Leica	Ca <sup>2+</sup> -Messungen
<b>Fluoreszenzlampe ebq 100 isolated</b>	Leistungselektronik Jena	Fluoreszenzmikroskopie
<b>Fluoreszenzlampe X-Cite 200DC</b>	Waltham	Ca <sup>2+</sup> -Messungen
<b>Heraeus Zentrifuge</b>	Thermo-Fisher	Zellisolation und Zellkultur
<b>HPLC Eicom HTEC-500 system</b>	Eicom	HPLC-Messungen
<b>Intas Scientific Grad Kamera</b>	Intas Science Imaging Instruments	Gelelektrophorese
<b>Intas Geldokumentationssystem</b>	Intas Science Imaging Instruments	Gelelektrophorese
<b>Kamera AxioCam color HR</b>	Zeiss	Fluoreszenzmikroskopie
<b>Kamera AxioCam monochrome MRm</b>	Zeiss	Fluoreszenzmikroskopie
<b>Kamera SMX-150M</b>	EHD-Imaging	PTS-, CBF-Messungen
<b>Kamera C11440 Orca-flash 4.0</b>	Hamamatsu	Ca <sup>2+</sup> -Messungen
<b>Kamera DP72</b>	Olympus	Dokumentation X-Gal
<b>Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop LSM 710</b>	Zeiss	Fluoreszenzmikroskopie
<b>Kraftaufnehmer Power Lab 8/30</b>	ADInstruments	Organbadversuche
<b>Kryostat Microm HM 560</b>	Thermo-Fisher	Herstellung von Gefrierschnitten

<b>Lichtmikroskop BX51WI</b>	Olympus	PTS-, CBF-Messungen
<b>Lichtquelle TH4-20</b>	Olympus	PTS-, CBF-Messungen
<b>Mikrotom</b>	Leica	Herstellung von Paraffinschnitten
<b>Mikrozentrifuge 5424</b>	Eppendorf	RNA- und Zellisolation
<b>Objektiv LUMPlanFI 40x</b>	Olympus	CBF-Messungen
<b>Objektiv UMPlanFI 20x</b>	Olympus	PTS-Messungen
<b>Organbad (4 Channel System)</b>	Radnoti	Organbad
<b>PerfectBlue™ Horizontal Elektrophoresekammer</b>	PEQLAB Biotechnologie GmbH	Gelelektrophorese
<b>peqPOWER 300 Volt Power Supply</b>	PEQLAB Biotechnologie GmbH	Gelelektrophorese
<b>Präzisionswaage SBA 31</b>	Scaltec Instruments GmbH	Puffer-Herstellung
<b>Prizmatix In-Vitro Optogenetics Toolbox</b>	Prizmatix	Optogenetische Experimente
<b>Schlauchpumpe Reglo Analog</b>	Ismatec	Ca <sup>2+</sup> -Messungen
<b>Schwingmühle MM 400 (Kugelmühle)</b>	Retsch	RNA-Isolation
<b>Stereomikroskop SZX16</b>	Olympus	Beurteilung X-Gal Färbung
<b>Spektralphotometer Nanodrop 2000</b>	Thermo-Fisher	RNA-Isolation
<b>Thermocycler Mastercycler Gradient</b>	Eppendorf	PCR
<b>Thermocycler Mastercycler Personal</b>	Eppendorf	cDNA-Synthese
<b>Ultraschallbad</b>	Bandelin SONOREX	Lösung von Pharmaka

### 2.1.5 Computerprogramme

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Computerprogramme sind in der Tab. 6 aufgeführt.

**Tabelle 6: Verwendete Computerprogramme deren Hersteller und die Homepage von der die Software bezogen werden kann.**

<b>Software</b>	<b>Firma</b>	<b>Homepage</b>
<b>Adobe Illustrator</b>	Adobe	<a href="https://www.adobe.com/de/products/illustrator.html">https://www.adobe.com/de/products/illustrator.html</a>
<b>AxioVision Rel. 4.8</b>	Zeiss	<a href="https://www.micro-shop.zeiss.com/de/de/system/software+axiovision-axiovision+basissoftware-software/10221/">https://www.micro-shop.zeiss.com/de/de/system/software+axiovision-axiovision+basissoftware-software/10221/</a>
<b>Biorender</b>	Biorender	<a href="https://biorender.com/">https://biorender.com/</a>
<b>BD FACSDIVA™ SOFTWARE V6.1.3</b>	BD Biosciences	<a href="http://www.bdbiosciences.com/us/instruments/research/software/flow-cytometry-acquisition/bd-facsdiva-software/m/111112/overview">http://www.bdbiosciences.com/us/instruments/research/software/flow-cytometry-acquisition/bd-facsdiva-software/m/111112/overview</a>
<b>CellSens Dimension</b>	Olympus	<a href="https://www.olympus-lifescience.com/de/software/cellsens/">https://www.olympus-lifescience.com/de/software/cellsens/</a>
<b>FLOWJO v10.6.1</b>	BD Biosciences	<a href="https://www.flowjo.com/solutions/flowjo">https://www.flowjo.com/solutions/flowjo</a>
<b>GraphPrism 7</b>	GraphPad Software	<a href="https://www.graphpad.com/scientificsoftware/prism/">https://www.graphpad.com/scientificsoftware/prism/</a>
<b>ImageJ 1.49</b>	NIH	<a href="https://imagej.nih.gov/ij/">https://imagej.nih.gov/ij/</a>
<b>Image Pro Analyzer 6.2</b>	Media Cybernetics	<a href="http://www.mediacy.com/imageproplus">http://www.mediacy.com/imageproplus</a>
<b>Inkscape Version 0.92.3</b>	Inkscape community	<a href="https://inkscape.org/">https://inkscape.org/</a>
<b>Labchart</b>	ADInstruments	<a href="https://www.adinstruments.com/products/labchart">https://www.adinstruments.com/products/labchart</a>
<b>LAS X Life science 1.10.12420</b>	Leica	<a href="https://www.leica-microsystems.com/de/produkte/mikroskop-software/">https://www.leica-microsystems.com/de/produkte/mikroskop-software/</a>
<b>MATLABR2016b</b>	MathWorks	<a href="https://www.mathworks.com/products/new_products/release2016b.html">https://www.mathworks.com/products/new_products/release2016b.html</a>
<b>Microsoft Office 2016</b>	Microsoft	<a href="https://www.microsoft.com/de-de/microsoft-365/">https://www.microsoft.com/de-de/microsoft-365/</a>
<b>Prizmatix Pulser V.2.3.1</b>	Prizmatix	<a href="https://www.prizmatix.com/software.html">https://www.prizmatix.com/software.html</a>
<b>ZEN 2010B SP1</b>	Zeiss	<a href="https://www.zeiss.de/mikroskopie/downloads/zen.html">https://www.zeiss.de/mikroskopie/downloads/zen.html</a>

## 2.1.6 Antikörper

## 2.1.6.1 Primärantikörper

Tabelle 7: Verwendete Primärantikörper für die Immunfluoreszenzmarkierung.

<b>Antigen</b>	<b>Wirts- spezies</b>	<b>Verdün- nung</b>	<b>Quelle</b>	<b>Katalog- Nr.</b>
<b>ChAT</b>	Ziege	1:250	Merck- Millipore	AB144P
<b>CGRP</b>	Ziege	1:8000	Biotrend	BT17-2090-07
<b>DCLK1</b>	Kaninchen	1:2000	abcam	ab31704
<b>GFP</b>	Huhn	1:4000	Novus	NB100-1614
<b>Gustducin (GNAT3)</b>	Ziege	1:800	Covalab	pab73402
<b>PGP 9.5</b>	Kaninchen	1:8000	Biotrend	BT78-6305-04
<b>PLC<math>\beta</math>2</b>	Kaninchen	1:800	Santa Cruz	sc-206
<b>Pou2f3</b>	Kaninchen	1:200	Sigma- Aldrich	HPA019652
<b>RFP</b>	Kaninchen	1:800	Rockland	42872
<b>TRPM5</b>	Kaninchen	1:4000	(Kaske et al. 2007)	N/A
<b>Villin</b>	Kaninchen	1:250	US Biological	V2121-95

2.1.6.2 Sekundärantikörper

**Tabelle 8: Verwendete Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenzmarkierung.**

Antigen	Wirts- spezies	Konjugat	Verdün- nung	Quelle	Katalog-Nr.
Hühner-IgY	Esel	FITC	1:800	Dianova	703-095-155
Kaninchen -IgG	Esel	Cy3	1:2000	Merck Millipore	AP182C
Kaninchen -IgG	Esel	Alexa Fluor 488	1:500	Thermo- Fisher	A-21206
Kaninchen -IgG	Esel	Cy5	1:400	Dianova	711-175-152
Ziegen IgG	Esel	Cy3	1:1600	Merck Millipore	AP180C
Ziegen IgG	Esel	Alexa Fluor 488	1:1000	Thermo Fisher	A-11055

2.1.6.3 Antikörper für FACS-Experimente

**Tabelle 9: Verwendete Antikörper für FACS-Experimente.**

Antigen	Wirtsspezies	Konjugat	Quelle	Katalog-Nr.
CD45	Rat	APC-Vio-770	Miltenyi	30-118-687
EPCAM (CD326)	Rat	VioBlue	Miltenyi	30-102-421

**2.1.7 Primer**

Die verwendeten *Primer* wurden von Eurofins Genomics (Eurofins, Luxembourg, Luxembourg) und Invitrogen (Invitrogen, Carlsbad, USA) bezogen. Diese wurden in einer Stocklösung mit einer Konzentration von 200 pmol/l angesetzt. *Forward-* und *Reverse-Primer* wurden im Anschluss zusammen in einer Gebrauchslösung mit einer Konzentration von 20 pmol/l zusammengebracht und in einer finalen Konzentration von 0,5-1 pmol/l in der PCR verwendet.

Tabelle 10: Verwendete *Primer* für die RT-PCR oder Genotypisierung.

Zielgen/Genotyp (Accession number)	Sequenz (5'-3')	Produktlänge (bp)
<i>Trpm5</i> -Wt	Fwd: AGTCAGGCTCCCATGGAGTA Rev: CTGACCTGTCCGATTTCCCTC	331
<i>Trpm5</i> -Ko	Fwd: CCTTCTATCGCCTTCTTGACG Rev: CTGACCTGTCCGATTTCCCTC	590
<i>Pou2f3</i> -Wt	Fwd: CCAAGATCTGGACTGCACTTCTTC Rev: ATCTGCGCACAGCCTTGTATCTTC	800
<i>Pou2f3</i> -Ko	Fwd: CCAAGATCTGGACTGCACTTCTTC Rev: GCAATCCATCTTGTTCAATGGCC	1600
$\beta$ -Aktin (NM_007393.5)	Fwd: CCATCATGAAGTGTGACGTTGA Rev: CATCGTACTCCTGCTTGCTGAT	249
<i>Chrm3</i> (NM_033269.4)	Fwd: GTACAACCTCGCCTTTGTTTCC Rev: GACAAGGATGTTGCCGATGATG	245
<i>Tas2r126</i> (NM_207028.1)	Fwd: GCAGTGTGTGGGATTGGTCAAC Rev: TCCCGGAGTACTCAACCAGATG	62
<i>Tas2r135</i> (NM_199159.1)	Fwd: GCCCTTTCAGAACTTCGGGA Rev: CCTGCCACATCCAGTACCTG	160
<i>Tas2r143</i> (NM_001001452.1)	Fwd: TTCCAGGCTGCTGGTTGTATC Rev: AGTTCCCGGTGGCTGAAATGAC	69
$\beta$ 2-Mikroglobulin (NM_009735)	Fwd: ATTCACCCCCACTGAGACTG Rev: GCTATTTCTTTCTGCGTGAT	192
<i>Fpr1</i> (NM_013521.2)	Fwd: GTCCAGAGCTGTTGGAAAGTTCA Rev: GTTTCATGCGGAAACCAGCC	228
<i>Fpr2</i> (NM_008039.2)	Fwd: TCATTTACACCACAGGAACCGAA Rev: ATCCGGAATCCAGCTACCCA	226
<i>Fpr-rs1</i> (NM_008042.2)	Fwd: TGAGCCTGGCTAGAAATGTGG Rev: TGGGCAAGCTGAAGCTAACA	201
<i>Fpr-rs3</i> (NM_008040.2)	Fwd: GGAGACACCAAGCAGCATTC Rev: GTTCAGAGTCGGCAGGACAT	225
<i>Fpr-rs4</i> (NM_008041.2)	Fwd: GGTCTCAGAATCACCGAACTGT Rev: CCTGAAGCTGTGGCAGCAATA	211
<i>Fpr-rs6</i> (NM_177316.2)	Fwd: TCGTCCTTTACGTGTCCTCACT Rev: GCTGTGTTACCCACGTGTC	137

<b><i>Fpr-rs7</i></b> (XM_030250194.1)	Fwd: CAATTGTCATGAATGGAGAATGGCT Rev: CACTTTCCTTGCCAGATTCACAG	185
<b><i>GFP</i></b> (XM_013480425.1)	Fwd: AAGTTCATCTGCACCACCG Rev: TCCTTGAAGAAGATGGTGCG	180
<b><i>Trpm5</i></b> (NM_020277.2)	Fwd: TATGGCTTGTGGCCTATGGT Rev: ACCAGCAGGAGAATGACCAG	235
<b><i>Itpr3</i></b> (NM_080553.3)	Fwd: ACAAGACAGACTACACCGGC Rev: ATGAGCTGGGAGGTGAGGT	197

### 2.1.8 Puffer und Lösungen

Tabelle 11: C1-Puffer zur Lösung der Peptide, Stoffmenge zur Herstellung von 100 ml Puffer.

Substanz	Mol. Gewicht (g/mol)	Konzentration (mM)	Stoffmenge
KCl	74.56	5	37 mg
NaCl	58.44	130	797 mg
CaCl <sub>2</sub> (2H <sub>2</sub> O)	147 (1 M Stocklsg.)	2	200 µl
Glucose	198.17	5	99 mg
Hepes	238.3	10	238 mg

Tabelle 12: Puffer und Lösungen für die Gewebefixierung und Immunhistochemie.

Name	Zusammensetzung
<b>Lösung A</b>	31,2 g Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ) in 1 Liter Aqua dest
<b>Lösung B</b>	35,6 g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ) in 1 Liter Aqua dest.
<b>PBS zur Verwendung in der Immunhistochemie</b>	28,75 ml Lösung A, 96,2 ml Lösung B, 22,4 g Natriumchlorid in 5 Liter Aqua dest. pH: 7,4
<b>PBS+S</b>	PBS mit zusätzlich 22,4 g Natriumchlorid pro Liter.
<b>Phosphatpuffer 0,1 M</b>	230 ml Lösung A, 770 ml Lösung B, 1 Liter Aqua dest., pH: 7,4
<b>Phosphatpuffer 0,2 M</b>	230 ml Lösung A, 770 ml Lösung B
<b>Gesättigte Pikrinsäure</b>	30 - 50 g Pikrinsäure werden in einem Liter heißem Aqua dest. gelöst und über Nacht unter Rühren inkubiert. Es bildet sich ein kristalliner Bodensatz. Die gesättigte Pikrinsäure bleibt als Überstand zurück und wird filtriert.
<b>Zamboni-Fixierlösung</b>	50 ml 37%ige Formaldehydlösung, 500 ml 0,2 M Phosphatpuffer und 150 ml gesättigte Pikrinsäure mit Aqua dest. auf einen Liter aufgefüllt.
<b>Saccharoselösung 18%</b>	18 g Saccharose aufgefüllt mit 0,1 M Phosphatpuffer auf 100 ml Gesamtvolumen
<b>Ethanol 70%</b>	66,5 g Ethanol 96%, 33,5 g Aqua dest.
<b>Citratpuffer (10mM)</b>	50 mM Stocklsg.: 9,62 g Citronensäure auf 1 l Aqua dest. pH-Wert auf 6,0 mit 2 M NaOH einstellen, für 10 mM Citratpuffer: 200 ml 50 mM Citratpuffer + 800 ml Aqua dest.
<b>Blocklösung (Gewebschnitte)</b>	10%iges Pferdeserum, 0,1%iges bovines Serumalbumin und 0,5%iges Tween 20 in PBS
<b>Blocklösung (Whole-Mount-Präparate)</b>	4%iges Pferdeserum, 1%iges bovines Serumalbumin
<b>Puffer#1</b>	2 mM $\text{MgCl}_2$ , 5 mM EGTA in PBS
<b>Puffer#2</b>	2 mM $\text{MgCl}_2$ , 0,01% Na-deoxycholate, 0,02% NP-40
<b>X-Gal-Färbelösung</b>	3,5 ml Puffer#2, 0,2 ml 0,1 M $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ , 0,2 ml 0,1M $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ , 0,1ml X-Gal Stocklsg. (40 mg/ml)

**Tabelle 13: Puffer und Lösungen für die FACS-Experimente.**

Name	Zusammensetzung
<b>Tyrode I</b>	NaCl 140 mM, KCl 5 mM, MgCl <sub>2</sub> 1 mM, Hepes 10 mM, Glukose 10 mM, Natriumpyruvat 1 mM
<b>Tyrode II</b>	NaCl 140 mM, KCl 5 mM, MgCl <sub>2</sub> 1 mM, CaCl <sub>2</sub> 1 mM, Hepes 10 mM, Glukose 5 mM, Brenztraubensäure 1 mM
<b>Dissoziationslösung</b>	10 µl L-Cystein (5 mM Stocklsg.), Papain 2mg, 0,5 µl DNase I, 4 µl EDTA (25 mM Stocklsg.) aufgefüllt auf 1 ml Volumen mit Tyrode I
<b>Stop-Lösung</b>	2 µl Leupeptin (5 mg/ml Stocklsg.) aufgefüllt auf 1 ml Volumen mit Tyrode II

**Tabelle 14: Puffer für die Gelelektrophorese.**

Name	Zusammensetzung
<b>TRIS-Azetat-EDTA-Puffer</b>	242 g TRIS (Tris(hydroxymethyl)aminomethan), 57,1 ml Eisessig, 100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 in 1 Liter Aqua dest..

**Tabelle 15: Hepes-Puffer für die Partikeltransport- und Zilienschlagmessungen.**

Stoffmenge zur Herstellung von 1000 ml Puffer, der pH-Wert durch Zugabe von 4,6 ml 1 M NaOH auf pH 7.4 eingestellt.

Substanz	Mol. Gewicht (g/mol)	Konzentration (mM)	Stoffmenge
<b>KCl</b>	7,56	5,6	418 mg
<b>NaCl</b>	58.44	136.4 (+4.6 NaOH)	7,97 g
<b>MgCl<sub>2</sub> (6H<sub>2</sub>O)</b>	203,3 (1 M Stocklsg.)	1	1 ml
<b>CaCl<sub>2</sub> (2H<sub>2</sub>O)</b>	147 (1 M Stocklsg.)	2.2	2,2 ml
<b>Glucose</b>	198,17	10	1,98 g
<b>Hepes</b>	238,3	10	2,38

**Tabelle 16: Locke-Puffer für die Messung der  $[Ca^{2+}]_i$  in Neuronen des JNC und M3-Reporterzellen.** Stoffmenge zur Herstellung von 1000 ml Puffer, der Puffer wurde für 30 min mit Carbogen (5%  $CO_2$  und 95  $O_2$ ) begast.

Substanz	Mol. Gewicht (g/mol)	Konzentration (mM)	Stoffmenge
KCl	74,56	5,6	418 mg
NaCl	58,44	136	7,97 g
MgCl <sub>2</sub> (6H <sub>2</sub> O)	203,3 (1 M Stocklsg.)	1,2	1,2 ml
CaCl <sub>2</sub> (2H <sub>2</sub> O)	147 (1 M Stocklsg.)	2,2	2,2 ml
Glucose	198,17	10	1,98 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	137,99	1,2	0,166 g
NaHCO <sub>3</sub>	84,01	14,3	1,2 g

### 2.1.9 Versuchstiere

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 26 verschiedene Mausstämmen verwendet. Dabei handelte es sich um zwei Wildtypstämmen (C57BL/6JRj, C57BL/6N), vier Reporterstämmen (*Chat*-GFP, *Trpm5*-eGFP, *Chrna3*-eGFP und *Tas2r*-mCherry), vierzehn gendefiziente Mausstämmen (*Knock-out* Stämme) (*Trpm5*-Ko, *Ip3r3*-Ko, *Plcβ2*-Ko, *Tas2r*-Ko, *Pou2f3*-Ko, *Fpr1*-Ko, *Fpr3*-Ko, *Nos3*-Ko, *Tas1r3*-Ko, *Tlr-2*-Ko, *Tlr-4*-Ko, *Myd88*-Ko, FVB/NCrl und *M3R*-Ko) sowie vier Mausstämmen, zu deren Herstellung das Cre/loxP-System angewandt wurde (*Trpm5*-IRES<sup>Cre</sup> / R26:lacZbpA<sup>flox</sup>DTA; D2-Tg(*Avi*<sup>flox</sup>)1Phep/Cnrm / B6129-Chatm1Jrs/J<sup>flox</sup>) und ein Mausstamm (*ChAT*-Chr2-YFP), welcher für optogenetische Experimente verwendet wurde (Tab. 17). Alle Mäuse wurden in individuell belüfteten Käfigen mit *ad libitum* Zugang zu Wasser und Futter unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen (SPF = *specific pathogen free*) und einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 14 h hell und 10 h dunkel gehalten. Für die Versuche wurden adulte Tiere beider Geschlechter ab einem Alter von 12 Wochen verwendet, außer für die Versuche im Kapitel 3.3.1, da an dieser Stelle jüngere Tiere sowie Embryonen verwendet wurden. Die Haltung und Tötung der Versuchstiere wurde von den zuständigen Behörden genehmigt. Die Aktenzeichen sind in Tab. 17 aufgeführt. Als Kontrolltiere für die gendefizienten Mäuse dienten in den Stämmen: *Ip3r3*-Ko, *Plcβ2*-Ko, *Tas2r*-Ko, *Pou2f3*-Ko, *Fpr1*-Ko, *Fpr3*-Ko, *Nos3*-Ko, *Tas1r3*-Ko, *Tlr-2*-Ko, *Tlr-4*-Ko und *Myd88*-Ko heterozygote bzw. homozygote Wildtyp-Tiere. Für die übrigen gendefizienten Mausstämmen (*Trpm5*-Ko und *M3R*-Ko) wurden Wildtyp-Mäuse mit dem gleichen genetischen Hintergrund wie der der Ko-Stämme verwendet. Bei allen Versuchen wurde stets darauf geachtet, dass auch Alter und Geschlecht

identisch zum homozygoten gendefizienten Tier waren, wenn möglich, wurden Geschwister (*Littermates*) verwendet. Die Kontrolltiere sind in den jeweiligen Ergebniskapiteln genauer erläutert.

**Tabelle 17: Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Mauslinien, deren Stammbezeichnung, Erstbeschreibung, Ort der Haltung sowie Genehmigungsnummer der jeweiligen Behörde.**

Gruppe	Laborname	Offizielle Stammbezeichnung	Charakteristik	Erstbeschreibung	Verwendete Methodik	Ort der Haltung	Genehmigung
Wildtyp-	C57BL/6J	C57BL/6JRj	Wildtyp		genereller Wildtypstamm	Gießen	571_M
	C57BL/6N	C57BL/6N	Wildtyp-Kontrollen		IHC, PTS	Gießen	571_M
Reporter-Stämme	<b>ChAT-eGFP</b>	B6.Cg-Tg(RP23-268L19-EGFP)2Mik/J	eGFP Expression unter <i>ChAT</i> -Promotor	(Tallini et al. 2006; Behrens und Meyerhof 2013)	IHC	Gießen	572_M
	<b>ChAT-eGFP</b>	von Engelhardt ChAT-eGFP	eGFP Expression unter <i>ChAT</i> -Promotor	(Engelhardt et al. 2007)	IHC - Embryonen	Marburg	Ex-13-2020
	<b>Trpm5-GFP</b>	Tg( <i>Trpm5</i> -EGFP)#Sdmk	eGFP Expression unter <i>Trpm5</i> -Promotor	(Clapp et al. 2006)	FACS	Gießen	624_M
	<b>α3-GFP</b>	<i>Chrna3</i> -eGFP	eGFP Expression unter <i>nAChR3</i> -Promotor	(Frahm et al. 2011)	Isolation von Neuronen, IHC	Gießen	714_M
	<b>Tas2r-mCherry</b>	B6-Tg( <i>Tas2R143</i> -mCherry)	mCherry Expression unter <i>Tas2R143</i> -Promotor	(Perniss et al. 2020b)	IHC	Gießen	693_M

## 2. Material und Methoden

<b>Knock-out-Stämme</b>	<b><i>Trpm5</i>-Ko</b>	B6.129P2- <i>Trpm5</i> <sup>tm1Dgen/J</sup>	Defizienz des Ionenkanals TRPM5	(Riera et al. 2009)	PTS, ACh-Messungen, Histopathologie	Gießen	573_M
	<b><i>Ip3r3</i>-Ko</b>	IP3R3 <sup>-/-</sup>	Defizienz des Inositol-1,4,5-Trisphosphate-Typ 3-Rezeptors	(Futatsugi et al. 2005)	PTS	Homburg	Saarbrücken 2.4.3.5
	<b><i>Plcβ2</i>-Ko</b>	PLCβ2 <sup>-/-</sup>	Defizienz der 1-Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase beta-2	(Jiang et al. 1997)	PTS	Homburg	Saarbrücken 2.4.3.5
	<b><i>Tas2r</i>-Ko</b>	B6.(Tas2r143-Tas2r135-Tas2r126) <sup>&lt;tm&gt;</sup>	Defizienz von Tas2r143,135 und 126	(Perniss et al. 2020b)	PTS	Bad Nauheim	692_M
	<b><i>Pou2f3</i>-Ko</b>	<i>Pou2f3</i> <sup>tm1Abek</sup>	Defizienz des Transkriptionsfaktors Pou2f3	(Matsumoto et al. 2011)	PTS	Gießen	641_M
	<b><i>Fpr1</i>-Ko</b>	C57BL/6NTac-Fpr1 <sup>tm1GaoN6</sup>	Defizienz des Formyl Peptid Rezeptors 1	(Gao et al. 1999)	PTS	Homburg	Saarbrücken 2.4.3.5
	<b><i>Fpr3</i>-Ko</b>	Fpr3 <sup>tm1b(EUCOM M)Hmgu</sup>	Defizienz des Formyl Peptid Rezeptors 3	(Bufe et al. 2019)	PTS, Histochemie	Homburg	Saarbrücken 2.4.3.5
	<b><i>Nos3</i>-Ko</b>	C57BL/6.129/Ola-eNOS <sup>tm</sup>	Defizienz der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase	(Gödecke et al. 1998)	PTS	Düsseldorf	O16/04
	<b><i>Tas1r3</i>-Ko</b>	B6;129-Tas1r3 <sup>tm1Csz/J</sup>	Defizienz des Tas1r3	(Zhao et al. 2003)	PTS	Gießen	632_M
	<b><i>Tlr-2</i>-Ko</b>	C57BL/10ScSn-TLR2 <sup>tm1</sup>	Defizienz des Toll-like-Rezeptors 2	(Werts et al. 2001)	IHC	Potsdam	23-2347-6-2009
	<b><i>Tlr-4</i>-Ko</b>	C57BL/10ScSn-TLR4	Defizienz des Toll-like-Rezeptors 4	(Lembo et al. 2003)	IHC	Potsdam	23-2347-24-2010
	<b><i>Myd88</i>-Ko</b>	B6.129-Myd88 <sup>tm1Aki</sup>	Defizienz des "Myeloid differentiation primary response" Proteins	(Adachi et al. 1998)	IHC	Charite Berlin, Marburg	EX-15-2018; T0294/10
	<b>FVB</b>	FVB/NCrl	Natürliche "knock-out" für FPR3		PTS	Gießen	571_M
	<b><i>M3R</i>-Ko</b>	B6N.129S6(B6J)-Chrm3 <sup>tm1Jwe/J</sup>	Defizienz des muskarinischen Acetylcholinrezeptors M3	(Yamada et al. 2001)	PTS	Gießen	717_M

## 2. Material und Methoden

<b>Zelltypspezifisch</b>	<b><i>Avi<sup>cre</sup>-ChAT<sup>fl/fl</sup></i></b>	B6;129-Chat <sup>tm1Jrs/J</sup> -B6;D2-Tg(Avil-cre)1Phep/Cnr m	Deletion der ChAT unter dem Promotor von Avilin	(Zurborg et al. 2011; Misgeld et al. 2002; Perniss et al. 2020b)	PTS	Marburg	Ex-16-2018, Ex-02-2021
<b>Zellablationsmodell</b>	<b><i>Trpm5-DTA</i></b>	Trpm5-IRES-Cre-R26:lacZbpA <sup>flo</sup> xDTA	Expression des Diphtherietoxins unter dem Promotor von TRPM5, Ablation von CCC	(Kusumakshi et al. 2015; Brockschneider et al. 2006; Perniss et al. 2020b)	PTS, Infektionsversuche	Homburg und Charite Berlin	G0266/11
<b>Optogenetisches Modell</b>	<b><i>ChAT-ChR2-YFP</i></b>	B6.Cg-Tg(Chat-COP4*H134R/EYFP,Slc18a3)6Gfng/J	Expression von Channelrhodopsin unter ChAT-Promotor	(Zhao et al. 2011)	Optogenetische Stimulation, PTS, ACh-Messungen	Marburg	Ex-01-2020

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Tötung der Versuchstiere und Gewebepräparation

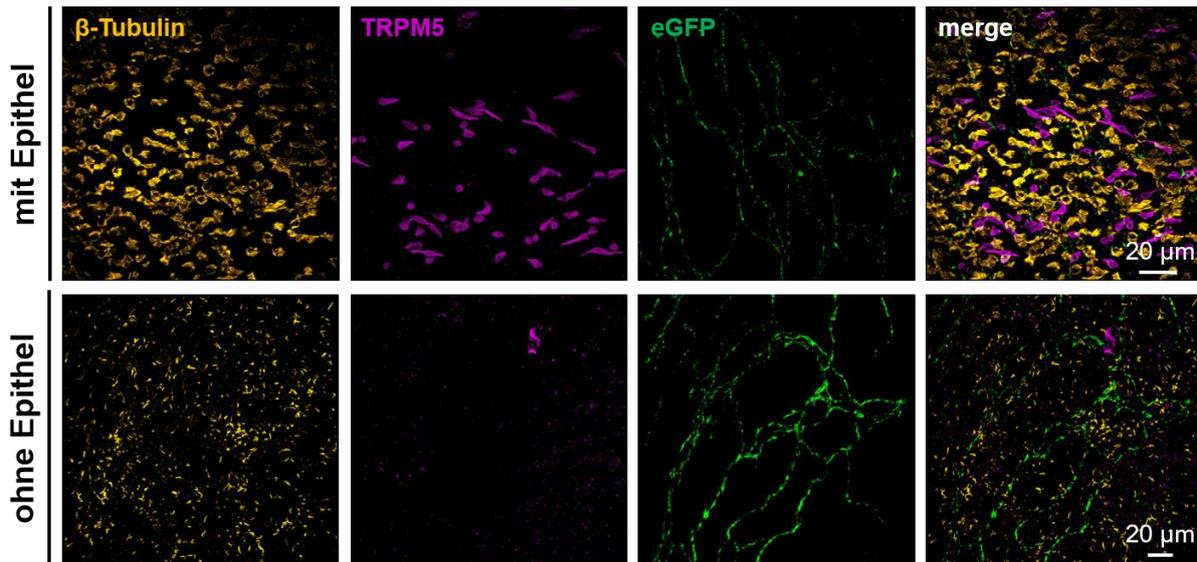
Die Tötung der Versuchstiere fand durch eine Betäubung mittels Isofluran-Inhalation (0,3 ml auf 1 Liter Gefäß) und anschließender Durchtrennung der *Vena cava inferior* und darauffolgender Entblutung der Tiere statt. Bei den Versuchstieren, welche in Homburg, Bad Nauheim, Düsseldorf und Potsdam gehalten wurden, erfolgte die Betäubung durch die Inhalation von CO<sub>2</sub> und anschließender Entblutung durch Durchtrennung der *Vena cava inferior*. Bei den Tieren, welche für die Infektionsversuche mit *Streptococcus pneumoniae* (*S.pneumoniae*) verwendet wurden, erfolgte die Euthanasie durch eine intraperitoneale Injektion von Ketamin und Xylazin (siehe Kapitel 2.2.13.2).

#### 2.2.1.1 Präparation der Trachea

Zur Präparation der Trachea wurde nach Eröffnung des Abdomens und erfolgter Entblutung der Tiere der Thorax ebenfalls eröffnet und ein medialer Schnitt bis zum Kehlkopfbereich durchgeführt. Anschließend wurde die infrahyale Muskulatur entfernt und die Trachea freigelegt. Darauffolgend wurden vorsichtig der Ösophagus und umliegendes Bindegewebe von der Trachea abpräpariert und die Trachea kranial im Kehlkopfbereich und kaudal unterhalb der Bifurkation abgesetzt. Für Whole-Mount-Präparationen wurde anschließend der *Musculus trachealis* längs durchtrennt, sodass die Trachea flach auf Wachsplatten unter Verwendung von Minutien fixiert werden konnte.

##### 2.2.1.1.1 Präparation des Trachealepithels für die RNA-Extraktion

Um die Expression von bestimmten Genen im Trachealepithel zu untersuchen, wurde dieses mechanisch entfernt. Hierzu wurde die Trachea wie zuvor beschrieben für die Herstellung von Whole-Mount-Präparaten präpariert. Nach Aufpinnen der Trachea auf Wachsplatten wurde die Trachea mit PBS benetzt und danach das Epithel mit einem Zellschaber entfernt. Hierzu wurde dieser ohne Druck über die Tracheaoberfläche geführt. Anschließend wurde das Gummi des Zellschabers mit einer Schere abgetrennt und in ein Reaktionsgefäß mit 200 µl RLT-Puffer mit 1% β-Mercaptoethanol überführt. Das Trachealepithel haftet dabei an dem Gummi des Zellschabers. Die restliche Trachea wurde mit PBS gewaschen und ebenfalls in RLT-Puffer mit β-Mercaptoethanol überführt. Die erfolgreiche Entfernung des Epithels wurde an zusätzlichen Präparaten überprüft. Hierzu wurde das Trachealepithel von *α3-GFP*-Reporter-mäusen in gleicher Weise entfernt und im Anschluss eine immunhistochemische Färbung durchgeführt. Als Kontrolle diente eine nicht behandelte Trachea. Die erfolgreiche mechanische Entfernung des Trachealepithels ist in Abb. 15 dargestellt.



**Abbildung 15: Kontrolle für die mechanische Entfernung des Trachealepithels.** IHC (Immunhistochemie) an Whole-Mount-Präparaten von Tracheen von  $\alpha 3$ -GFP-Reportermausen (Falschfarbendarstellung, CLSM, Maximumintensitätsprojektion 25 optische Schnitte je 3-4  $\mu\text{m}$ ). Zilientragende Zellen sind mit Antikörpern gegen  $\beta$ -Tubulin angefärbt, SCCC sind TRPM5-positiv, nAChR3-positive Nervenfasern sind eGFP-positiv. Oberes Panel zeigt intaktes Epithel, unteres Panel zeigt Whole-Mount-Präparat nach mechanischer Entfernung des Epithels. Zilientragende Zellen sowie SCCC sind nicht mehr vorhanden, Nervenfasern, welche sich unterhalb des Epithels im Gewebe befinden, sind nicht beeinträchtigt. Die  $\beta$ -Tubulin-Färbung zeigt nur noch abgeschilferte einzelne Zilien, welche nicht vom Präparat gewaschen werden konnten.

#### 2.2.1.2 Präparation der Geschmacksknospen

Zur Entnahme der Geschmacksknospen wurde die Zunge nach Absetzen des Unterkiefers am Zungenansatz abgetrennt. Anschließend wurde unter dem Binokular die Wallpapille (*Papilla vallata*) identifiziert und kurz oberhalb und unterhalb das übrige Zungengewebe entfernt.

#### 2.2.1.3 Präparation des Vomeronasalorgans

Zur Präparation des VNO wurde der Schädel der Maus abgetrennt und die Kopfhaut, Augen sowie der Unterkiefer entfernt. Darauffolgend wurde der Schädel hinter den Augen abgesetzt, sodass nur noch der vordere Schädelbereich mit Augenhöhle und Nasenbereich und Oberkiefer vorhanden war. Anschließend wurde dieser Schädelteil mit Hilfe eines Skalpells der Länge nach gespalten. Dabei wurde der Schnitt ca. 2 mm neben der Mittellinie durchgeführt. Danach wurde das VNO durch Entfernen des Knorpels rund um das VNO freigelegt. Für die histochemischen Untersuchungen wurde das VNO anschließend eröffnet, um das Epithel darstellen zu können. Für RT-PCR-Experimente wurde das gesamte VNO entnommen und weiterverarbeitet.

### 2.2.1.4 Präparation des *Ganglion jugulare*- und *Ganglion nodosum*-Komplexes

Zur Präparation des *Ganglion jugulare* und *Ganglion nodosum*-Komplexes (JNC) wurde der Schädel von  $\alpha 3$ -GFP-Mäusen abgetrennt, die Schädeldecke eröffnet und das gesamte Hirn entfernt. Anschließend wurde das Felsenbein entfernt. Im Zuge dessen wurde der *Nervus vagus* sichtbar. Dieser wurde mit Hilfe einer Pinzette fixiert und vorsichtig nach oben gezogen. Dies führte zum Sichtbarwerden des JNC, dieses wurde abgetrennt und für die Isolation der Neurone weiterverarbeitet.

### 2.2.2 Immunhistochemische Färbungen

Für immunhistochemische Färbungen wurde das Gewebe direkt nach der Entnahme in Zamboni-Fixierlösung (Tab. 12) überführt und über Nacht fixiert. Anschließend wurde es in 0.1 M Phosphat-Puffer (Tab. 12) gewaschen, bis die Pufferlösung nicht mehr gelblich war.

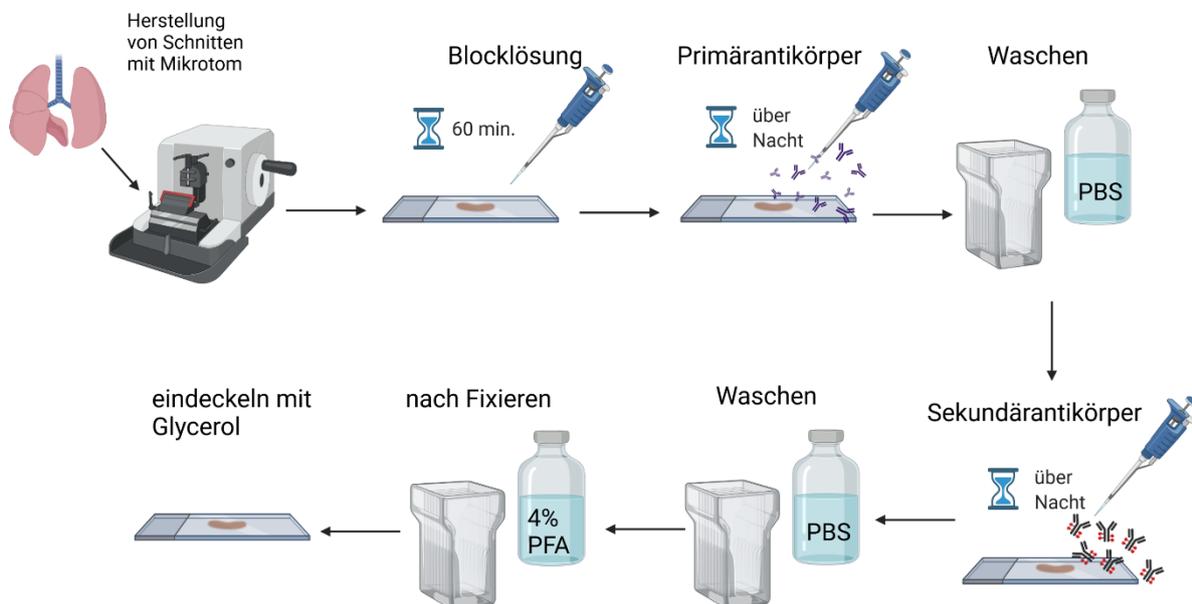
Zur Herstellung von Gefrierschnitten wurden die Gewebe in 18 % Saccharoselösung (Tab. 12) über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Gewebe in Tissue-Tek-O.C.T.-Compund in Cryomold-Kryoeinbettformen eingebettet und in durch flüssigen Stickstoff gekühltem 2-Methylbutan auf einem Filterpapier eingefroren. Die Gewebe wurden bis zur Verwendung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Darauf folgend wurden unter Verwendung eines Kryostaten 10  $\mu\text{m}$  dicke Gewebeschnitte angefertigt. Diese wurden auf einen Adhäsionsobjektträger aufgezogen und für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln getrocknet.

Für die Herstellung von Paraffinschnitten wurde das Gewebe nach der Fixation und anschließendem Waschen in Histologiekassetten überführt und unter Verwendung eines Einbettautomates in Paraffin überführt. Anschließend wurden mit einem Mikrotom 5  $\mu\text{m}$  dicke Paraffinschnitte hergestellt. Diese wurden über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  getrocknet und bis zur Verwendung bei Raumtemperatur gelagert.

#### 2.2.2.1 Immunhistochemische Färbungen an Gewebeschnitten

Für die Immunhistochemie an Paraffinschnitten wurde zunächst eine Antigendemaskierung durchgeführt. Hierzu wurden die Schnitte in Citratpuffer (Tab. 12) für 15 min in der Mikrowelle bei 800 W erhitzt und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Gefrierschnitte wurden für 1 h bei Raumtemperatur erneut getrocknet und anschließend die Immunhistochemie durchgeführt. Hierzu wurden die Gefrier- und Paraffinschnitte mit einem Fettstift umrandet, um das Verlaufen der Antikörperlösungen zu verhindern. Nach kurzem Trocknen wurde die Blocklösung (Tab. 12) aufgetragen und die Schnitte bei Raumtemperatur im Dunkeln für 1 h in einer feuchten Kammer inkubiert. Dies vermindert unspezifische Antikörperbindungen, zudem enthält die Blocklösung das Detergens Tween 20, welches zu einer Permeabilisierung der Zellmembran führt, was wiederum das Eindringen der Antikörper

in die Zellen ermöglicht. Alle weiteren Inkubationsschritte fanden ebenfalls im Dunkeln und in einer feuchten Kammer statt. Die Blocklösung wurde im Anschluss abgesaugt und die Primärantikörperlösung aufgetragen (Tab. 7) und über Nacht inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Schnitte zweimal für 5 min in PBS gewaschen und anschließend die Sekundärantikörperlösung (Tab. 8) aufgetragen, dieser wurde DAPI (0,16 mg/ml) zugesetzt, welches die DNA in den Zellkernen markiert. Nach 1-stündiger Inkubation wurden die Schnitte 2x für 5 min in PBS gewaschen und anschließend für 10 min in 4% PFA (Paraformaldehyd) nachfixiert. Darauffolgend wurde wieder zweimal in PBS gewaschen und kurz angetrocknet. Abschließend wurden die Gewebeschnitte mit gepuffertem Glycerol beträufelt und mit Präzisionsdeckgläsern eingedeckelt (Abb. 16). Die Schnitte wurden bei 4°C im Dunkeln bis zur Beurteilung gelagert.

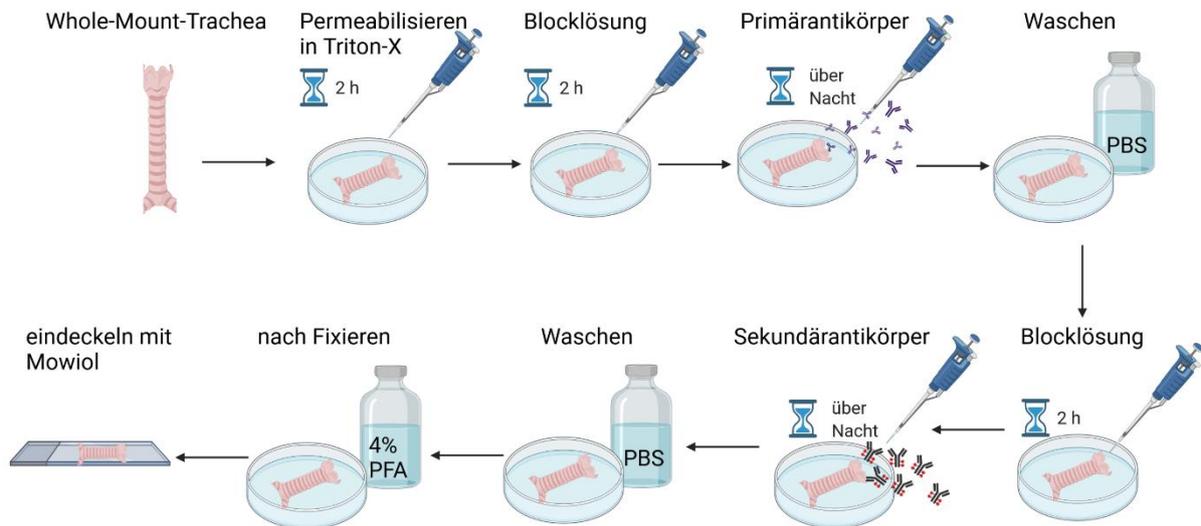


**Abbildung 16: Schematische Darstellung der Immunhistochemie an Gewebeschnitten.**

### 2.2.2.2 Immunhistochemische Färbungen an Whole-Mount-Präparaten

Die Whole-Mount-Präparate wurde nach erfolgter Fixierung und Spülung in PBS nochmals in frischem PBS für 15 min gewaschen und anschließend zur Permeabilisierung der Zellmembranen für 2 h in 0,3 % Triton-X 100 inkubiert. Alle Inkubationsschritte fanden im Dunkeln und in einer feuchten Kammer statt. Anschließend wurde das Detergens durch Blocklösung (Tab. 7) ausgetauscht und die Präparate nochmals für 2 h inkubiert. Im Anschluss wurde die Primärantikörperlösung aufgetragen und die Präparate über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden diese fünfmal für je 30 min in PBS gewaschen und darauffolgend nochmals Blocklösung aufgetragen und für 2 h inkubiert. Im Anschluss wurde die Sekundärantikörperlösung (mit DAPI 0,16 mg/ml) aufgetragen und über Nacht inkubiert. Am

nächsten Tag wurden die Präparate fünfmal für je 30 min in PBS gewaschen und darauffolgend für 10 min in 4% PFA fixiert, danach wieder fünfmal für je 30 min in PBS gewaschen und auf Objektträger überführt. Die Präparate wurde mit Mowiol beträufelt und eingedeckelt. Anschließend wurden die Objektträger über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert, um das Mowiol auszuhärten (Abb. 17). Anschließend wurden die Präparate bis zur Mikroskopie bei 4°C im Dunkeln gelagert.



**Abbildung 17:** Schematische Darstellung der Immunhistochemie an Whole-Mount-Präparaten.

### 2.2.2.3 Quantitative Auswertung der Immunhistochemie

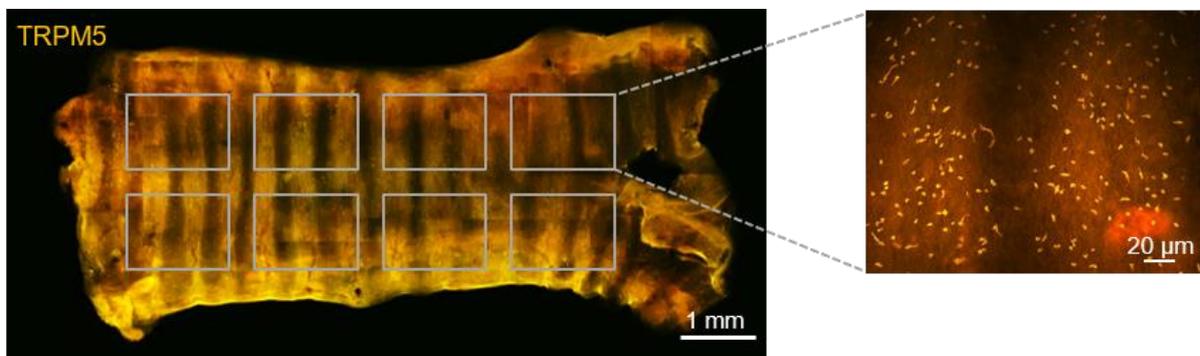
#### 2.2.2.3.1 an Gewebeschnitten

Um die Anzahl von SCCC in verschiedenen Mausstämmen miteinander zu vergleichen, wurde diese quantifiziert. Hierzu wurden die Gewebsschnitte unter Verwendung eines Fluoreszenzmikroskops (AxioPlan, Zeiss) untersucht, dazu wurden die markierten Zellen pro Schnitt bei einer 20x Objektivvergrößerung manuell am Mikroskop gezählt. Anschließend wurde die Länge der Basallamina des jeweiligen Schnittes mit der Software AxioVision bestimmt. Hierzu wurde der Schnitt mit einer Objektivvergrößerung von 5x aufgenommen und die Basallamina vermessen. Anschließend wurde das Verhältnis von markierten Zellen pro mm oder pro 2 mm Länge der Basallamina ermittelt. Diese Methodik wurde für die Bestimmung der SCCC-Anzahl der Mausstämme C57BL/6J, *TRPM5*-Ko, *Trpm5*-DTA, *Tlr*-Wt, *Tlr2*-Ko, *Tlr4*-Ko und *Tlr2/4*-Ko verwendet. Es wurden mindestens 3 Objektträger mit jeweils mindestens 2 Schnitten je Tier ausgewertet. Um die Kollokalisation von TRPM5 und mCherry in *Tasr2*-mCherry-Mäusen zu untersuchen, wurden ebenfalls 3 Objektträger mit jeweils mindestens 2 Schnitten je Tier beurteilt. Hierzu wurde jede TRPM5-markierte Zelle auf eine

Doppelmarkierung hin überprüft, zudem wurde überprüft, ob jede mCherry-positive Zelle auch TRPM5-positiv war.

### 2.2.2.3.2 an Whole-Mount-Präparaten

Hierzu erfolgten Aufnahmen mit einem Fluoreszenzmikroskop (AxioPlan, Zeiss) bei einer 20x Objektivvergrößerung, dabei wurden die Aufnahmen so gewählt, dass die gesamte Tracheaoberfläche aufgenommen wurde, die Randbereiche sowie der Bereich des Larynx wurden jedoch nicht beurteilt. Eine beispielhafte Anordnung der Aufnahmen ist in Abb. 18 dargestellt. Diese Technik kam bei der Beurteilung der Mausstämmen *Pou2f3-Ko*, *ChAT-eGFP* sowie bei keimfreien Mäusen zur Anwendung. Im Rahmen der Untersuchung der Entwicklung der SCCC wurden unabhängig vom Alter der *ChAT-eGFP*-Tieren alle GFP-positiven Zellen pro Trachea gezählt. Um die Kolokalisation von TRPM5 und Channelrhodopsin in *ChAT-ChR2-YFP*-Mäusen und die Kolokalisation von GFP und ChAT, GFP und TRPM5, sowie GFP und DCLK1 in *ChAT-GFP*-Mäusen zu untersuchen, wurden ebenfalls Aufnahmen bei einer 20x Objektivvergrößerung hergestellt. Diese wurden anschließend unter Verwendung des Plug-In *Cell-Counter* der Software ImageJ beurteilt. Dabei wurde jede einzelne Zelle auf eine Kolokalisation der jeweiligen Marker hin untersucht. Bei allen quantitativen Untersuchungen an Whole-Mount-Präparaten wurden je nach Größe des Präparates 4-8 Bilder untersucht.



**Abbildung 18: Quantifizierung von SCCC an Whole-Mount-Präparaten.** Whole-Mount-Präparat einer Trachea einer adulten C57BL/6J-Maus, Immunhistochemie mit Antikörpern gegen TRPM5. Linkes Bild: Zusammengesetzte Aufnahme der gesamten Trachea, graue Kästen indizieren die Aufnahmen, welche für die Quantifizierung der SCCC genutzt wurden. Rechtes Bild: Aufnahme 20x Objektivvergrößerung, Beispielbild, an dem eine Quantifizierung durchgeführt wurde. Modifiziert aus Perniss et al. 2021.

### 2.2.3. Histochemische Färbung – $\beta$ -Galactosidase

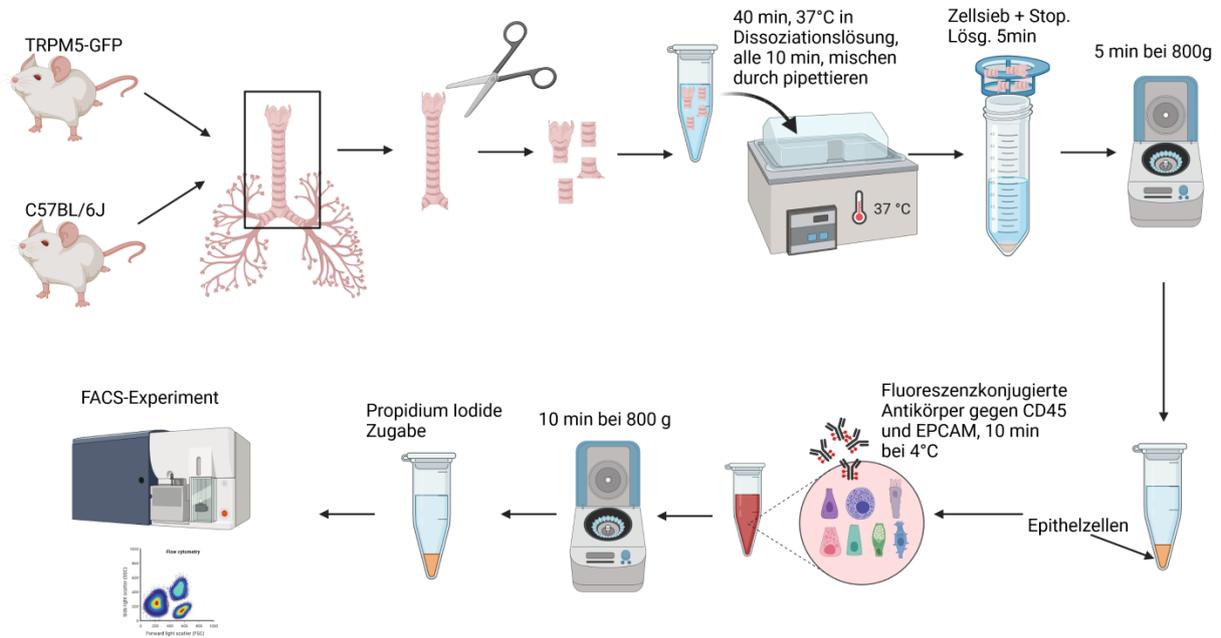
Um zu untersuchen, ob der Fpr3 im Trachealepithel exprimiert wird, wurden histochemische Färbungen mit X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid) an Tracheen und dem VNO von Fpr3-Ko-Mäusen durchgeführt. Hierzu wurden die Trachea und das VNO wie im

Abschnitt 2.2.1.3 beschrieben entnommen und anschließend für 1 h bei 4°C in 2% PFA fixiert. Danach wurde das Gewebe für 15 min in Puffer#1 (Tab. 12) inkubiert und anschließend in Puffer#2 (Tab. 12) überführt und ebenfalls für 15 min inkubiert. Anschließend erfolgte die X-Gal-Färbung unter Verwendung der X-Gal-Färbelösung (Tab. 12) über Nacht bei 4°C und unter Schütteln im Dunkeln. Am nächsten Tag wurde die Reaktion durch Waschen des Gewebes in PBS für 20 min gestoppt. Die Gewebe wurden bis zur Beurteilung in 2% PFA verwahrt. Die mikroskopische Untersuchung fand unter Verwendung eines Stereomikroskops (Olympus) statt, die Bilder wurden mit einer Farbkamera (DP72, Olympus) aufgenommen.

### **2.2.4 Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS)**

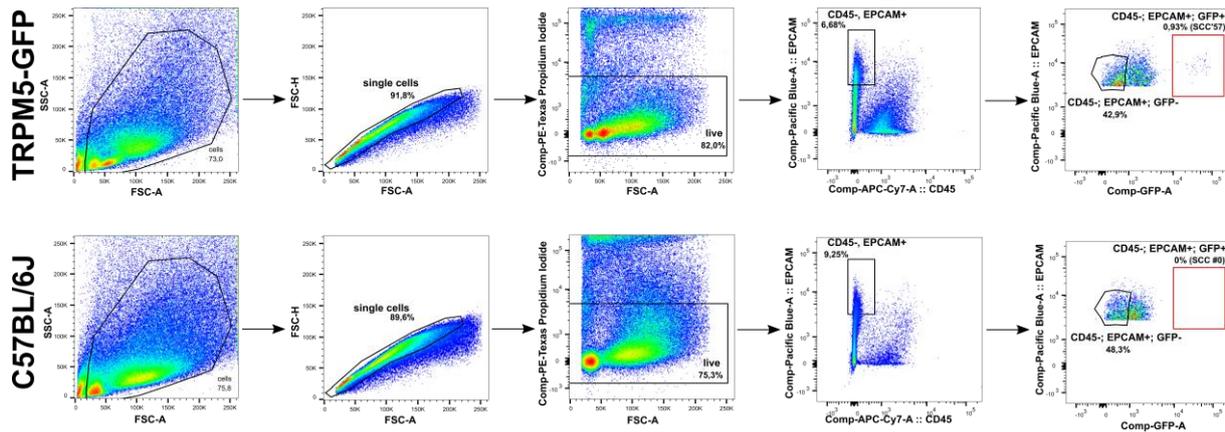
Für die FACS-Untersuchungen wurden die Tracheen von *Trpm5*-GFP-Tieren genutzt. Ziel war es, die Expression von verschiedenen Genen in trachealen Epithelzellen auf mRNA-Ebene zu untersuchen. Für jeden Versuch wurden jeweils Tracheen von 3-4 adulten *Trpm5*-GFP Tieren gepoolt. Als Kontrolle dienten die Tracheen von adulten C57BL/6J-Mäusen, auch hier wurden 3-4 Tiere gepoolt. Die Isolation der Epithelzellen ist in Abb. 19 dargestellt und fand nach einem modifizierten Protokoll statt, welches bereits publiziert wurde (Krasteva et al. 2011). Hierzu wurden die Tracheen wie in Abschnitt 2.2.1.1 beschrieben präpariert, der *Musculus trachealis* wurde ebenfalls durchtrennt, anschließend wurde jede Trachea jedoch nochmals zerteilt, sodass 3-4 Stücke bestehend aus je 2-3 Knorpelspangen entstanden. Diese Tracheastücke wurden anschließend in die Dissoziationslösung (Tab. 13) überführt und bei 37°C im Wasserbad für 40 min inkubiert. Dabei wurden die Tracheen alle 10 min aus dem Wasserbad entnommen und mittels einer Pipette (1000 µl) mehrmals durchmischt, dies sollte zu einer zusätzlichen mechanischen Vereinzelung der Zellen führen. Die Dissoziationslösung (Tab. 13) war frei von Ca<sup>2+</sup>-Ionen, und enthielt die Enzyme DNaseI und Papain, in der Kombination sollte dies zu einer Lösung des Epithels von der Basallamina sowie der Zellvereinzelung dienen. Nach der Inkubation wurden die Tracheaprobe nochmals mit einer Pipette durchmischt und die gesamte Lösung mit den Trachearingen auf ein Zellsieb gegeben (70 µm Maschenweite), der Durchfluss wurde gesammelt und die Trachearinge verworfen. Anschließend wurde die Stopp-Lösung (Tab. 13) dazugegeben und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Stopp-Lösung enthält Leupeptin sowie Calcium, was den weiteren Verdau stoppt. Im Anschluss wurde die Lösung mit den Trachealzellen für 5 min bei 800 g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das entstandene Pellet in 300 µl FACS-Puffer resuspendiert. Im Anschluss erfolgte die Markierung der isolierten Zellen mit Antikörpern gegen CD45 (Immunzellen) und CD326-EPCAM (Epithelzellen) (Tab. 9). Hierzu wurden die Antikörper in einer Verdünnung von 1:50 auf die Zellsuspension gegeben und für 10 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 2 ml FACS-Puffer gewaschen und darauffolgend bei 800 g für 10 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellen in 2 ml FACS-Puffer

resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf Eis gelagert und die FACS-Experimente schnellstmöglich durchgeführt. Kurz vor der FACS-Durchführung wurde Propidium Iodid (4 Tropfen) hinzugegeben; dieser Farbstoff ermöglicht es, tote von lebenden Zellen abzugrenzen.



**Abbildung 19: Schematische Darstellung der Isolation von Epithelzellen aus der Trachea.**

Die FACS-Experimente wurden unter Verwendung eines BD FACS Aria III Cell Sorters durchgeführt. Zunächst wurden die Zellen nach ihrer Größe (FSC-A *forward scatter*) und Granularität (SSC-A, *side scatter*) aufgetrennt, dies ermöglichte den Ausschluss von Zellfragmenten und Debris. Im Anschluss wurden einzelne Zellen von Zellaggregaten getrennt (FSC-H gegen FSC-A). Daraufhin wurden tote Zellen unter Verwendung von Propidium Iodide (PI-positiv) aussortiert. Die lebenden einzelnen Zellen wurden anschließend auf eine Markierung mit den Antikörpern gegen CD45 (APC-Cy7) oder EPCAM (VioBlue) hin untersucht. EPCAM-positive, aber CD45-negative Zellen wurden daraufhin auf eine Fluoreszenz im FITC-Kanal (GFP-positiv) hin untersucht. Sowohl GFP-positive als auch GFP-negative Zellen, welche EPCAM-positiv waren, wurden anschließend getrennt voneinander in FACS-Puffer aufgefangen. Das Protokoll der Gating-Strategie ist in Abb. 20 dargestellt. Bis zur RNA-Isolation wurden die Proben auf Eis gelagert. Die gleichen Versuche wurden ebenfalls mit C57BL/6J-Tieren durchgeführt. Dies diente zur Kontrolle ob nicht genetisch veränderte Tiere nicht auch GFP-positive Epithelzellen aufwiesen. Dies war jedoch nicht der Fall (Abb. 20).



**Abbildung 20:** Gating-Strategie für die Isolation von GFP-positiven (rotes Rechteck) und GFP-negativen (schwarze Markierung) Epithelzellen. Modifiziert aus Perniss et al. 2020b.

## 2.2.5 PCR-Untersuchungen

### 2.2.5.1 Genotypisierungen

Die Genotypisierungen der Mausstämmen *Trpm5-Ko*, *Pou2f3-Ko* und *M3R-Ko*, *Trpm5-GFP* und *Chat-GFP* (siehe Tab. 17) wurden anhand von Schwanz- oder Ohrstanzbiopsien am Institut für Anatomie und Zellbiologie der JLU Gießen durchgeführt. Alle anderen Mausstämmen wurden in den jeweiligen Instituten, in denen diese gehalten wurden, genotypisiert. Alle Tiere wurden jeweils nach dem Absetzen vom Muttertier sowie nach der Tötung des Versuchstieres erneut genotypisiert.

#### 2.2.5.1.1 DNA-Extraktion

Die DNA-Extraktion aus den Schwanz- oder Ohrstanzbiopsien wurde unter Verwendung des DNeasy® Blood & Tissue Kits nach der Anleitung des Herstellers durchgeführt. Hierzu wurden die Biopsien in 180 µl ATL Puffer und 20 µl Proteinase K bei 56°C unter Schütteln über Nacht verdaut. Anschließend wurde dem Lysat 200 µl AL-Puffer hinzugegeben und für 10 min bei 56°C inkubiert. Darauffolgend wurde die DNA durch die Zugabe von 200 µl 100% Ethanol (EtOH) gefällt und die Suspension anschließend auf eine *DNeasy Mini*-Säule gegeben und für 1 min bei 8000 rpm (rounds per minutes) zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und 500 µl AW1-Waschpuffer hinzugegeben. Die Säule wurde anschließend nochmals bei 8000 rpm für 1 min zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Im Anschluss wurde 500 µl AW2-Waschpuffer hinzugegeben und erneut bei 14 000 rpm für 3 min zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Darauffolgend wurde die DNA durch Zugabe von 50 µl AE-Puffer eluiert. Dazu wurde die Säule für 1 min inkubiert und anschließend für 1 min bei 6000 rpm zentrifugiert. Die isolierte DNA wurde bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.5.1.2 PCR

Für die Bestimmung oder Überprüfung des Genotyps von Mäusen der Linien *Trpm5*-Ko und *Pou2f3*-Ko wurden für jedes Tier zwei PCR-Reaktionen durchgeführt. Diese unterschieden sich jeweils in den eingesetzten Primern. Eine PCR führte zu einem PCR-Produkt spezifisch für den Wt-Genotyp, die andere PCR zu einem Produkt spezifisch für den Ko-Genotyp. Proben heterozygoter Tiere wiesen jeweils beide PCR-Produkte auf. Bei Proben der Mauslinie *M3R*-Ko wurde nur eine PCR spezifisch für den Ko-Genotyp durchgeführt, da diese homozygot von Jackson-Lab bestellt wurden. Die eingesetzten Primer sind in der Tab. 10 aufgelistet. Der Reaktionsmix für die PCR ist in der Tab. 18 sowie der Ablauf der PCR-Reaktion in der Tab. 19 aufgelistet. Die PCR wurde unter Verwendung eines Thermocyclers (Mastercycler-Eppendorf) durchgeführt.

**Tabelle 18: Reaktionsmix für die PCR zur Genotypisierung.**

Komponenten	Menge
TaKaRa Ex Taq Polymerase	0,1 µl
PCR Buffer	2 µl
RNase-freies Wasser	13,3 µl
dNTP-Mix je 10 mM	1,6 µl
Primer-Mix (Forward und Reverse)	1 µl
DNA	2 µl
<b>=20 µl</b>	

**Tabelle 19: PCR-Protokoll für die Genotypisierung.**

Nummer	PCR-Schritt	Temperatur	Dauer
1	Aktivierung Polymerase	94°C	3 min
2	DNA-Denaturierung	95°C	30 s
3	Primerhybridisierung	60°C	60 s
4	Elongation	72°C	120 s
2-4	Schritte 2-4 für 30 Zyklen wiederholt		
5	Finale Elongation	72°C	10 min
6	Lagerung	4°C	dauerhaft

### 2.2.5.1.3 Gelelektrophorese

Die Auswertung der PCR erfolgte mittels DNA-Gelelektrophorese. Hierzu wurde ein 2% TRIS-Azetat-EDTA Agarosegel hergestellt, welches mit 2 µl Ethidiumbromid je 100 ml versetzt wurde. An die Gelkammer wurde eine Spannung von 140 Volt über 40 min angelegt. Abschließend wurden die PCR-Produkte mittels UV-Licht visualisiert und mit einer Digitalkamera dokumentiert (Intas Geldokumentationssystem). Die Aufnahmen wurden anschließend unter Verwendung von ImageJ bearbeitet, dabei wurden die Helligkeit und der Kontrast grundsätzlich im gesamten Bild verändert.

### 2.2.5.2 RT-PCR von Gewebe, Blut und isolierten trachealen Epithelzellen

#### 2.2.5.2.1 RNA-Isolation

##### 2.2.5.2.1.1 RNA-Isolation aus Gewebe

Das Gewebe (Lunge, Zunge, Trachea, Trachealepithel und VNO), welches für die RNA-Extraktion vorgesehen war, wurde direkt nach der Präparation in 200-350 µl RLT-Puffer mit 1% β-Mercaptoethanol überführt, in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bis zur RNA-Isolation bei -80°C gelagert. Die RNA-Isolation fand unter Verwendung des RNeasy Mini Kit von Qiagen nach Anleitung des Herstellers statt. Hierzu wurden die Proben direkt nach dem Auftauen mit einer Schwingmühle (5 min bei 30 Hz) homogenisiert. Im Anschluss wurden die Proben bei 13.000 rpm für 3 min in einer Mikrozentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen und mit dem gleichen Volumen an 70%-igem Ethanol versetzt und mit einer Pipette vermischt. Anschließend wurden 700 µl dieser Lösung auf eine RNeasy Mini Säule gegeben, anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 13 000 rpm für 15 s, der Durchfluss wurde verworfen. Darauf folgend wurde 700 µl RW1-Puffer auf die Säule gegeben und diese nochmals für 15 s bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule erneut mit 500 µl RPE-Puffer beladen und für 15 s bei 13 000 rpm zentrifugiert. Dieser Schritt wurde wiederholt, jedoch die Zentrifugationszeit auf 2 min verlängert. Im Anschluss wurde die Säule auf ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gesetzt und 30-50 µl RNase-freies Wasser direkt auf die Säulenmembran pipettiert, dies führte zu einer Elution der RNA. Im Anschluss wurde die Säule für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und die Säule im Anschluss verworfen. Der Durchfluss enthielt die gewonnene RNA, deren Konzentration und Reinheit unter Verwendung eines Nanodrop 2000 Spektrometers bestimmt wurde. Die extrahierte RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### 2.2.5.2.1.2 RNA-Isolation aus Blut

Um RNA aus Blut zu isolieren, wurde das GF-1 Blood Total RNA Extraction Kit der Firma Vivantis verwendet. Hierzu wurde das aus der *Vena cava* entnommene Blut durch Zugabe von von 300 µl BR-Puffer (enthält 1 % β-Mercaptoethanol) lysiert. Anschließend wurden 180 µl RNase-freies Wasser und 20 µl der Proteinase K-Lösung hinzugegeben und das Gemisch für 10 min bei 65°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation der Probe bei 13.000 rpm für 3 min. Im Anschluss wurde 650 µl des Überstandes auf eine Homogenisierungssäule gegeben und für 2 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde anschließend in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 325 µl 80%-iges Ethanol dazugeben. Das Gemisch wurde im Anschluss auf die RNA Binding Column gegeben und bei 13.000 rpm für 1 min zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Im Anschluss wurde 500 µl Wasch-Puffer auf die Säule gegeben und für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Dieser Waschschrift wurde wiederholt und im Anschluss die Säule auf ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Säule wurde nochmals bei 13.000 rpm für 1 min zentrifugiert, um diese zu trocknen. Im Anschluss wurde die RNA durch Zugabe von 40 µl RNase-freiem Wasser auf die Membran der Säule eluiert. Die Säule wurde abschließend für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und die eluierte RNA bei -80°C bis zur Verwendung gelagert.

### 2.2.5.2.1.3 RNA-Isolation aus isolierten trachealen Epithelzellen

Um die RNA aus per FACS isolierten trachealen Epithelzellen zu extrahieren, wurden diese nach den in Abschnitt 2.2.4 beschriebenen FACS-Experimenten zentrifugiert. Hierzu wurde das RNeasy Plus Micro Kit verwendet. Als Proben dienten EPCAM-positive Zellen, welche entweder ebenfalls GFP-positiv waren, oder Zellen, welche GFP-negativ waren. Diese beiden Proben wurden anschließend bei 800 rpm für 10 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 350 µl RLT Plus Puffer (enthält 1 % β-Mercaptoethanol) gelöst. Anschließend wurde das Lysat auf eine gDNA-Eliminator-Säule gegeben und für 30 s bei 10.000 rpm zentrifugiert. Dem Durchfluss wurde anschließend 350 µl 70%-iges Ethanol hinzugegeben. Das Gemisch wurde anschließend auf eine RNeasy MinElute Säule gegeben und für 15 s bei 10.000 rpm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Im Anschluss wurde die Säule durch Zugabe von 700 µl RW1-Puffer gewaschen und für 15 s bei 10.000 rpm zentrifugiert. Danach wurde 500 µl RPE-Puffer auf die Säule gegeben und nochmals für 15 s bei 10.000 rpm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Darauf folgend wurde 500 µl 80%-iges Ethanol auf die Säule gegeben und diese für 2 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Im Anschluss wurde die Säule auf ein Reaktionsgefäß gegeben und nochmals für 5 min bei voller Geschwindigkeit zentrifugiert, um diese zu trocknen. Die RNA wurde abschließend durch Zugabe von 14 µl RNase-freiem Wasser eluiert. Hierzu wurde dieses auf die Membran der

Säule pipettiert und für 1 min bei voller Geschwindigkeit zentrifugiert. Die eluierte RNA wurde bei -80°C bis zur Verwendung gelagert.

#### 2.2.5.2.2 cDNA-Synthese

##### 2.2.5.2.2.1 cDNA-Synthese aus Gewebe und Blut

Für die cDNA-Synthese wurde die isolierte RNA in einer Konzentration von max. 2000 ng in 16 µl Synthese-Ansatz eingesetzt. Dies entspricht einer Konzentration von 125 ng/µl. War die RNA-Konzentration geringer, wurden 16 µl RNA eingesetzt, war diese höher, wurde RNase-freies Wasser hinzugegeben, sodass ein Endvolumen von 16 µl vorlag. Diesem 16 µl Ansatz wurde 2 µl DNase I und 2 µl 10xDNase I Reaction Buffer hinzugegeben. Es folgte eine 15-minütige Inkubation bei 25°C im Thermocycler. Dieser Schritt führte zu einem Verdau von genomischer DNA, welche als Verunreinigung vorliegen könnte. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 µl 25 mM EDTA und 10-minütiger Inkubation bei 65°C gestoppt. Die Proben wurden auf Eis gelagert und der Mastermix (Tab. 20) hinzugegeben. Dabei diente der Mastermix-Ansatz ohne SuperScriptII Reverse Transcriptase (-RT) als Kontrolle, um eine Verunreinigung der synthetisierten cDNA durch genomische DNA auszuschließen. Die Mastermix-Ansätze wurden anschließend für 50 min bei 42°C (cDNA-Synthese) und für weitere 10 min bei 70°C (Inaktivierung der Polymerase) inkubiert. Die synthetisierte cDNA wurde im Anschluss bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

**Tabelle 20: cDNA-Synthese-Mastermix für Gewebe und Blut.**

Komponenten	+RT	-RT
First strand buffer	4 µl	4 µl
0,1 M DTT	2 µl	2 µl
10 mM DNTPs	1 µl	1 µl
Oligo DT 0,5 µg/µl	0,5 µl	0,5 µl
Random Hexamers	0,5 µl	0,5 µl
SuperScript II Reverse Transcriptase	1 µl	0 µl
RNase-freies Wasser	0 µl	1 µl
RNA-Ansatz	11 µl	11 µl
<b>Gesamtvolumen:</b>	<b>20 µl</b>	<b>20 µl</b>

2.2.5.2.2.2 cDNA-Synthese aus isolierten trachealen Epithelzellen

Die cDNA-Synthese der isolierten Epithelzellen wurde mit einer anderen Reverse Transkriptase durchgeführt als die cDNA-Synthese von Gewebe oder Blut-Proben. Hier wurde das SuperScript III Synthesis System verwendet. Es wurde ebenfalls ein DNA-Verdau durchgeführt, hierzu wurde die gesamte isolierte RNA (14 µl) aus Abschnitt 2.2.5.2.1.3 eingesetzt. Dieser wurden 1,8 µl DNase I und 1,8 µl 10xDNase I Reaktionspuffer hinzugegeben. Es folgte eine 15-minütige Inkubation bei 25°C im Thermocycler, anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 1,8 µl 25 mM EDTA und 10-minütige Inkubation bei 65°C gestoppt. Es ergab sich dadurch ein Gesamtvolumen von 19,4 µl, diesem wurde noch 0,6 µl RNase-freies Wasser hinzugegeben. Im Anschluss wurden jeder Probe 1 µl Oligo(dT)20 (50 mM), 1 µl *random Primers* und 1 µl 10 mM dNTP Mix hinzugegeben und für 5 min bei 70°C im Thermocycler und darauffolgend für 2 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden 11 µl dieses Ansatzes jeweils mit 4 µl des Mastermixes (Tab. 21) mit oder ohne reverser Transkriptase vermischt, sodass je Probe 16 µl cDNA und 16 µl –RT-Kontrolle vorlagen. Im Anschluss wurden die Ansätze bei 50°C für 50 min inkubiert und die Reaktion durch eine Erhitzung auf 85°C für 5 min abgeschlossen. Die synthetisierte cDNA wurde im Anschluss bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

**Tabelle 21: cDNA-Synthese-Mastermix für isolierte tracheale Epithelzellen.**

Komponenten	+RT	-RT
5x RT buffer	3 µl	3 µl
RNaseOUT (40 U/µl)	0,5 µl	0,5 µl
0,1M DTT	0,5 µl	0,5 µl
SuperScript III reverse Transcriptase	1 µl	0 µl
RNase-freies Wasser	0 µl	1 µl
RNA-Ansatz	11 µl	11 µl
<b>Vol. gesamt:</b>	<b>16 µl</b>	<b>16 µl</b>

## 2.2.5.2.3 PCR

Für die PCR wurde als Template die in Abschnitt 2.2.5.2.2 synthetisierte cDNA verwendet. Die Primer (Tab. 10) wurden jeweils im gleichen Verhältnis (*forward* und *reverse*) miteinander vermischt und mit den anderen in Tab. 22 aufgeführten Komponenten des PCR-Reaktionsmixes zusammengebracht. Die PCR wurde mit einem Thermocycler (Thermocycler Mastercycler Gradient) nach dem in Tab. 23 aufgeführten Programm durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden im Anschluss mittels Gelelektrophorese wie in Abschnitt 2.2.5.1.3 beschrieben nach ihrer Größe aufgetrennt und mittels UV-Licht visualisiert.

Tabelle 22: Reaktionsmix für die PCR.

Komponenten	Menge
AmpliTaq Gold	0,1 µl
10x PCR Buffer	2 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1,6
RNase-freies Wasser	13,8 µl
dNTP-Mix je 10 mM	0,5 µl
Primer-Mix (Forward und Reverse)	1 µl
DNA	1 µl
<b>=20 µl</b>	

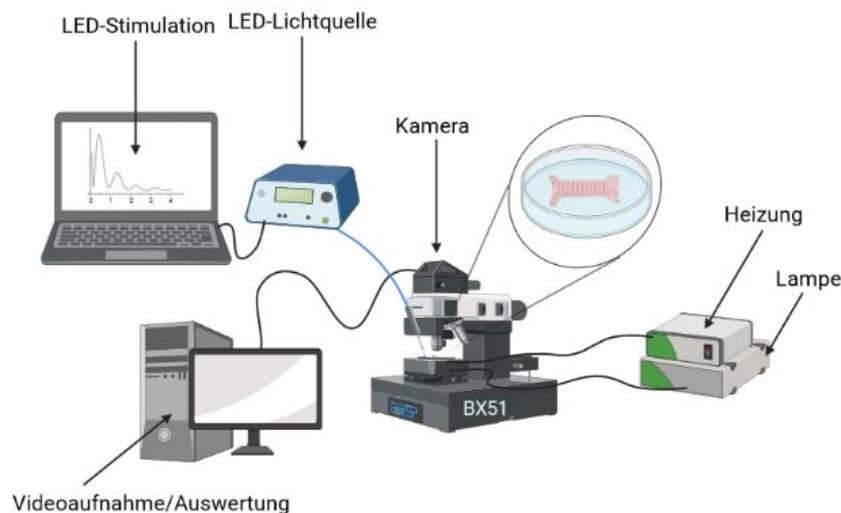
Tabelle 23: PCR-Protokoll.

Nummer	PCR-Schritt	Temperatur	Dauer
1	Aktivierung Polymerase	95°C	3 min
2	DNA-Denaturierung	95°C	30 s
3	Primerhybridisierung	60°C	30 s
4	Elongation	72°C	30 s
2-4	Schritte 2-4 für 40 Zyklen wiederholt		
5	Finale Elongation	72°C	7 min.
6	Lagerung	4°C	dauerhaft

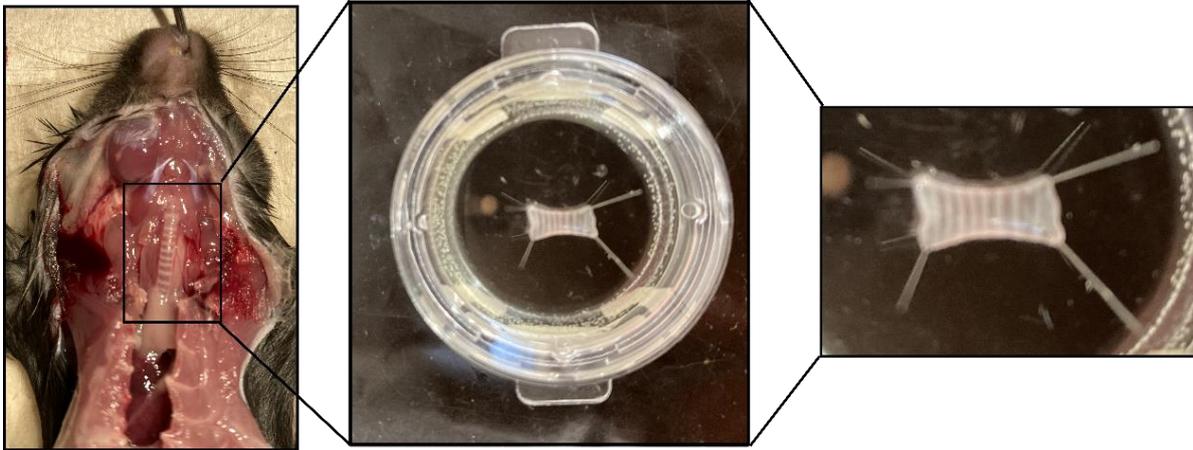
## 2.2.6 Partikeltransportmessungen

### 2.2.6.1 Vorbereitung

Der Versuchsaufbau für die PTS- (*particle transport speed*) und CBF- (*ciliary beat frequency*) Messungen ist in Abb. 21 dargestellt. Die Trachea wurde wie in Abschnitt 2.2.1.1 beschrieben präpariert und wie bei Whole-Mount-Präparaten wurde der *Musculus trachealis* der Länge nach aufgeschnitten. Die Trachea wurde anschließend in ein Delta-T-Kulturschälchen überführt, welches zuvor mit 1,5 ml Sylgard (Silikonelastomer) ausgegossen wurde. Die Trachea wurde mit Minutien so aufgespannt, so dass das Trachealepithel nach oben in Richtung des Objektivs zeigte. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Trachea nicht zu sehr gestreckt wurde (Abb. 22). Anschließend wurde das Delta-T-Schälchen in die Halterung des Objektisches eingespannt, 2 ml vorgewärmter Hepes-Puffer (Tab. 15) hinzugegeben und die Heizung gestartet. Diese wurde so eingestellt, dass im Schälchen eine Temperatur von 30-31°C vorlag; diese wurde während der gesamten Messung in regelmäßigen Abständen kontrolliert. Die Trachea wurde unter einem 20x Eintauchobjektiv betrachtet. Zum Zeitpunkt des Todes des Versuchstieres (Durchtrennung der *Vena cava*) wurde eine Stoppuhr gestartet; in der Regel vergingen vom Tod bis zur fertigen Präparation der Trachea und Überführung in das Mikroskop 5-6 min. In das Schälchen wurden 20 min nach dem Tod des Tieres 2 µl Dynabeads hinzugegeben, dies entspricht in etwa 60.000 Polystyrenkügelchen. Die Messung der PTS begann 30 min nach dem Tod des Versuchstieres.



**Abbildung 21: Versuchsaufbau für Partikeltransport- und Zilienschlagmessungen.** An ein Lichtmikroskop (Olympus BX51) mit einem beheizbaren Objektisch (Delta-T-Dish-System) wurde eine Digitalkamera (Sumix SMX150) angeschlossen und die Kamera mit einem Computer verbunden, auf dem die Videos aufgenommen werden (Streampix III). An diesem Computer erfolgte auch die Auswertung der Videos (Image Pro Analyzer). Für die optogenetischen Experimente wurde eine LED-Lichtquelle (Prizmatix In-Vitro Optogenetics Toolbox) verwendet, welche LED-Licht mit einer Wellenlänge von 456 nm emittierte. Die Pulsdauer und Frequenz (8 Hz, 60 ms) wurde mit Hilfe der Software Primzatic Pulser V.2.3.1 gesteuert.



**Abbildung 22: Präparation der Trachea für Partikeltransport- und Zilienschlagmessungen.** Linkes Bild: Trachea wurde freigelegt, der Rahmen kennzeichnet die Lage der Trachea, welche anschließend kaudal des Larynx und oberhalb der Bifurkation abgesetzt wurde (Bifurkation ist im Bild durch den Thymus (weißliches Gewebe) verdeckt). Mittleres Bild: Trachea wurde entnommen, der *Musculus trachealis* durchtrennt und die Trachea mit Minutien fixiert. Rechtes Bild: Vergrößerung der aufgespannten Trachea, Knorpelspannen sind als weißliche Steifen zu erkennen; zwischen den Knorpelspannen, in den transparenter erscheinenden Bereichen, wurden die Messungen durchgeführt.

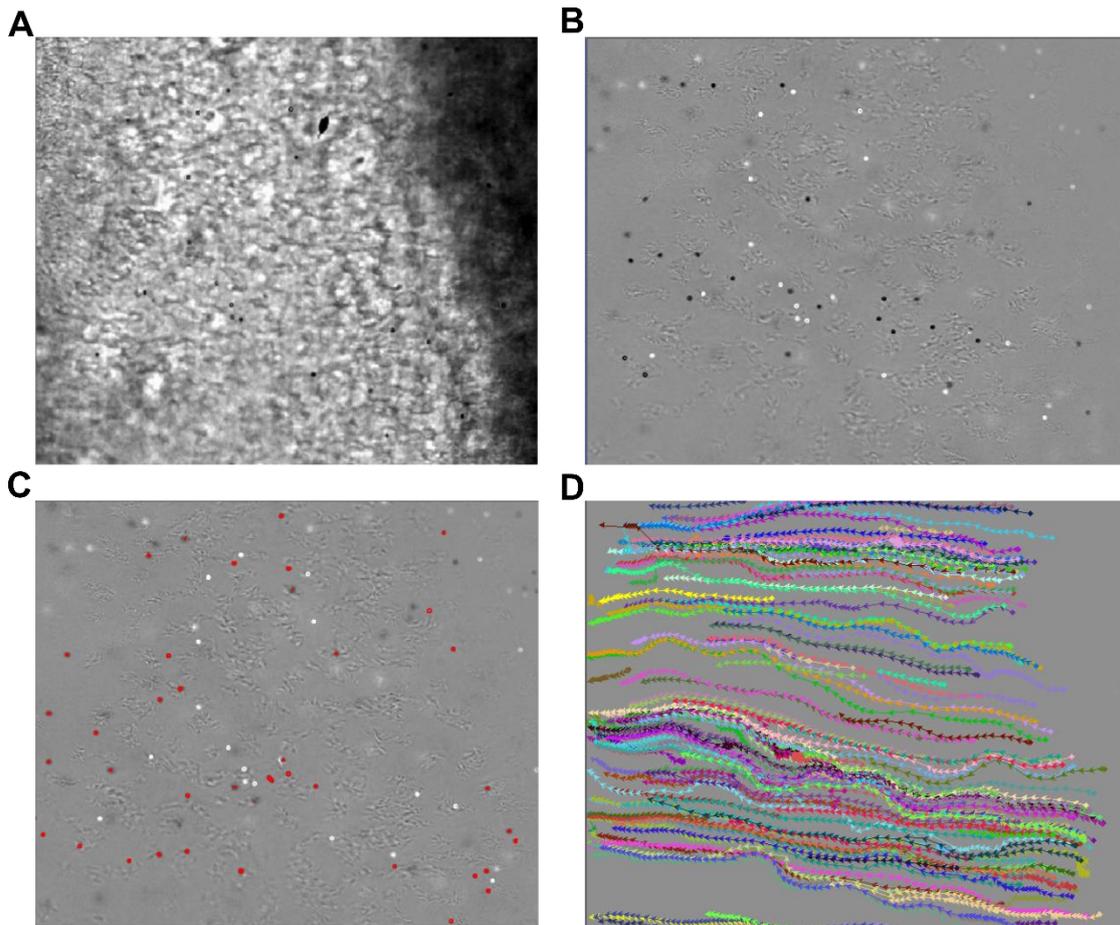
### 2.2.6.2 Durchführung

Für die Messung wurde ein Bereich zwischen den Knorpelspannen ausgewählt, welcher ungefähr in der Mitte der präparierten Trachea lag. Es wurde auf die sich bewegenden Dynabeads kurz oberhalb der Zilien fokussiert. Die PTS-Messung startete 30 min nach dem Tod des Tieres, bis zur 55. Minute wurde alle 5 min Videos aufgenommen, danach bis zum Ende des Versuches alle 2 min. Jedes Video bestand aus 200 Aufnahmen, welche mit einer Belichtungszeit von 20 ms und einem Abstand zwischen den Bildern von 85 ms aufgenommen wurden, daraus ergibt sich eine ungefähre Videolänge von ~16 s (12 Bilder/s). Die Videos wurden mit einer Digitalkamera Sumix SMX150 und einer Auflösung von 640 x 51 Pixeln aufgenommen. Die Zugabe der Substanzen erfolgte manuell mittels einer Pipette. Dazu wurde die Substanz neben die Trachea pipettiert und im Anschluss der Puffer vermischt. Vor jedem Video (60 s) wurde ebenfalls der Puffer vermischt, dies führte zu einer gleichmäßigen Verteilung der Dynabeads vor jeder Videoaufnahme. Als Lebendkontrolle diente ATP (100  $\mu$ M), welches jeweils 8-10 min vor dem Ende des Versuches hinzugegeben wurde. Versuche wurden nur berücksichtigt, wenn die PTS um mindestens 30% auf ATP oder die zuvor applizierte Substanz anstieg. Die zu untersuchende Substanz wurde zum Zeitpunkt min 59 nach Tötung hinzugefügt. Wurden mehrere Substanzen oder verschiedene Konzentrationen getestet, erfolgte die nächste Applikation 10 min später. Die Versuche wurden auf eine Dauer von 110 min nach Tötung des Tieres beschränkt.

Für die optogenetischen Experimente wurde eine LED-Lichtquelle (Prizmatix In-Vitro Optogenetics Toolbox) verwendet, welche LED-Licht mit einer Wellenlänge von 456 nm für 2 min emittierte. Dabei betrug die Pulsdauer 60 ms mit einer Frequenz von 8 Hz.

### 2.2.6.3 Auswertung

Für die Auswertung der aufgenommenen Filme wurden diese mit der Software Image Pro Analyzer verarbeitet. Zuerst wurden die Filme von 12 Bit auf 8 Bit umgewandelt (Abb. 23A). In einem zweiten Schritt wurde durch die Software der Hintergrund abgezogen, dabei werden sich bewegende Objekte, z.B. die Partikel, in Schwarz dargestellt (Abb. 23B). In einem weiteren Schritt wurde manuell der Schwellenwert so gesetzt, dass nur die sich bewegenden Partikel ausgewertet wurden (Abb. 23C). Dieser Schritt ist nötig, da die Software nicht in der Lage ist, andere Objekte, welche sich ebenfalls bewegen, z.B. Zilien, von den sich bewegenden Partikeln zu unterscheiden. Um die PTS zu berechnen, wurde die Durchschnittsgeschwindigkeit bestimmt, mit der sich die Partikel über die Tracheaoberfläche bewegen. Dabei wurden nur Partikel berücksichtigt, welche in mindestens 10 aufeinander folgenden Bildern sichtbar waren. Für jeden Partikel wurde eine Durchschnittsgeschwindigkeit in  $\mu\text{m/s}$  berechnet und dann die Geschwindigkeit aller Partikel gemittelt. Die Geschwindigkeit der Partikel wurde durch die zurückgelegte Distanz des Partikels zwischen zwei Bildern berechnet. Im Durchschnitt wurden pro Video 50 bis 300 Partikel ausgewertet (Abb. 23D). Um den Effekt von Substanzen auf die PTS zu untersuchen, wurde die PTS vor Applikation mit dem Wert 8 min nach Applikation verglichen und entweder der Unterschied in  $\mu\text{m/s}$  oder %-Anstieg im Vergleich zum Wert vor der Applikation bestimmt. Auch bei der optogenetischen Stimulation wurde die PTS vor und 8 min nach Applikation des LED-Stimulus bestimmt und der prozentuale Anstieg ermittelt.

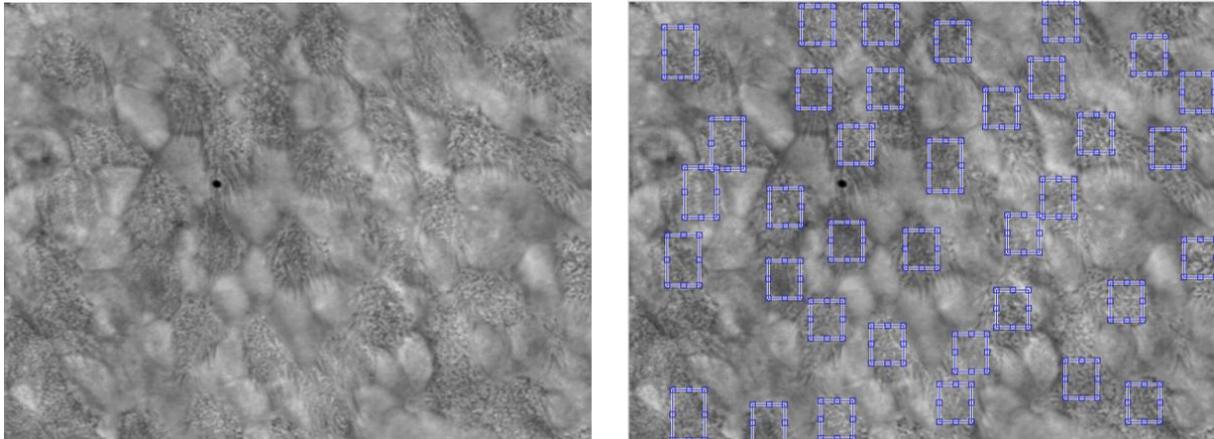


**Abbildung 23: Auswertung der PTS-Messungen.** **A:** Originalaufnahme einer C57BL/6J-Trachea 30 min nach dem Tod des Tieres. Dynabeads (Partikel) sind als schwarze Punkte zu erkennen. **B:** Gleiche Aufnahme wie in A in 8-bit Greyscale, nach Abzug des Hintergrundes. Partikel sind als schwarze Punkte zu erkennen, weiße Punkte stellen den Startpunkt von Partikeln dar, sich bewegende Zilien sind ebenfalls zu erkennen. **C:** Einstellung des Schwellenwertes für die Erkennung der Partikel, Partikel, welche ausgewertet werden, sind rot markiert. **D:** Die Strecke, welche einzelne Partikel im Verlauf des Films zurückgelegt haben, ist als Pfeil zu erkennen.

### 2.2.7 CBF-Messungen

Für die CBF-Messungen wurde die Trachea in gleicher Weise präpariert und vorbereitet, wie für die PTS-Messungen. Ebenso wurde das gleiche experimentelle Equipment verwendet, jedoch wurde ein Eintauchobjektiv mit 40x Vergrößerung verwendet. Es wurde so fokussiert, dass die Zilien zu erkennen waren. Für die CBF-Versuche wurden Tracheen unabhängig von PTS-Versuchen verwendet. Die Videos wurden zu den gleichen Zeitpunkten wie bei den PTS-Messungen aufgenommen. Die Videos wurden jedoch mit einer höheren Bildrate aufgenommen; so wurde eine Belichtungszeit von 7,7 ms und ein Abstand zwischen zwei Bildern von 7,5 ms gewählt (105 Bilder/s), es wurden 1000 Aufnahmen pro Video aufgenommen, die durchschnittliche Filmlänge betrug 11 s. Für die Auswertung der Videos wurde ein Plug-In für die Software MATLABP verwendet. Dieses Plug-In wurde von Herrn Dr.

Mario Pieper und Herrn Prof. Dr. Peter König von der Universität Lübeck programmiert. Das Plug-In wertet dabei Unterschiede in der Helligkeit von einzelnen Pixeln unter Verwendung der Fourier Transformation aus. Für die Auswertung wurden die einzelnen zilienträgenden Zellen manuell markiert und jeweils ROI (*regions of interest*) gesetzt (Abb. 24). Zur Substraktion des Hintergrundes wurde ein ROI auf eine Stelle gesetzt, in der sich keine zilienträgenden Zellen befanden. Pro Video wurden 25-40 Zellen ausgewertet und der Mittelwert pro Video gebildet, die CBF wurde in Hz angegeben.



**Abbildung 24: Auswertung der CBF-Messungen. Linkes Bild:** Durchlichtaufnahme bei 40x Objektivvergrößerung, zilienträgende Zellen zu erkennen. **Rechtes Bild:** ROI (blaue Kästchen) wurden so gesetzt, dass sich nur Zilien in den ROI befanden.

### 2.2.8 Kontraktionsmessungen der Harnblase

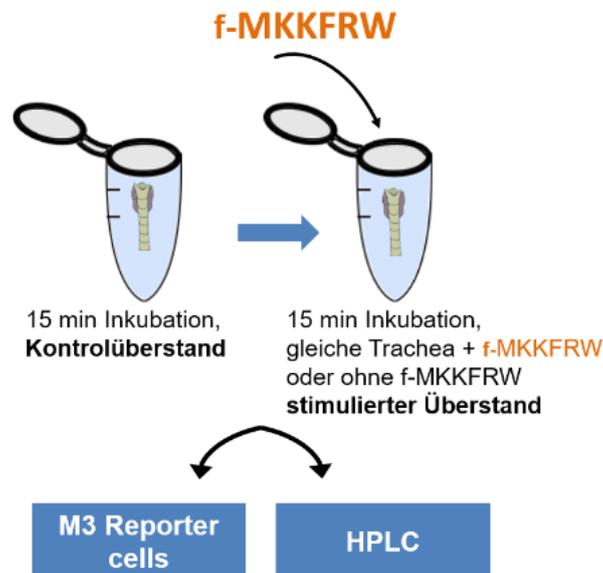
Die Kontraktionsmessungen der Harnblase von Tas2r-Ko-Mäusen wurden von Frau Maryam Keshavarz, PhD, am Institut für Anatomie und Zellbiologie der JLU durchgeführt. Hierzu wurde die Harnblase der Tiere präpariert und längs in zwei Hälften geteilt. Diese wurden in MEM-Medium versetzt mit 1% Penicilin und Streptomycin überführt und in ein Organbad an Häkchen eingespannt. Die Temperatur wurde konstant auf 37°C gehalten, die Messungen wurden in MEM-Medium durchgeführt. Das Medium wurde ständig mit einem Gasgemisch aus 21 % O<sub>2</sub> und 79% N<sub>2</sub> durchgast. Die Häkchen wurden jeweils mittels eines Fadens mit einem Kraftaufnehmer (PowerLab 8/30) verbunden und die Kontraktionskraft mit der Software Labchart aufgezeichnet. Bestimmt wurde in Kontraktionskraft in Gramm.

### 2.2.9 Stimulation der Trachea für ACh-Konzentrationsmessungen

Die Trachea wurde für diese Versuche in Hepes-Puffer mit 10 µM-Eserin inkubiert. Eserin verhindert den Abbau von ACh durch Esterasen. Der Hepes-Puffer war stets auf 37°C vorgewärmt. Die gewonnen Überstände wurden jeweils direkt nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

### 2.2.9.1 Stimulation mit f-MKKFRW

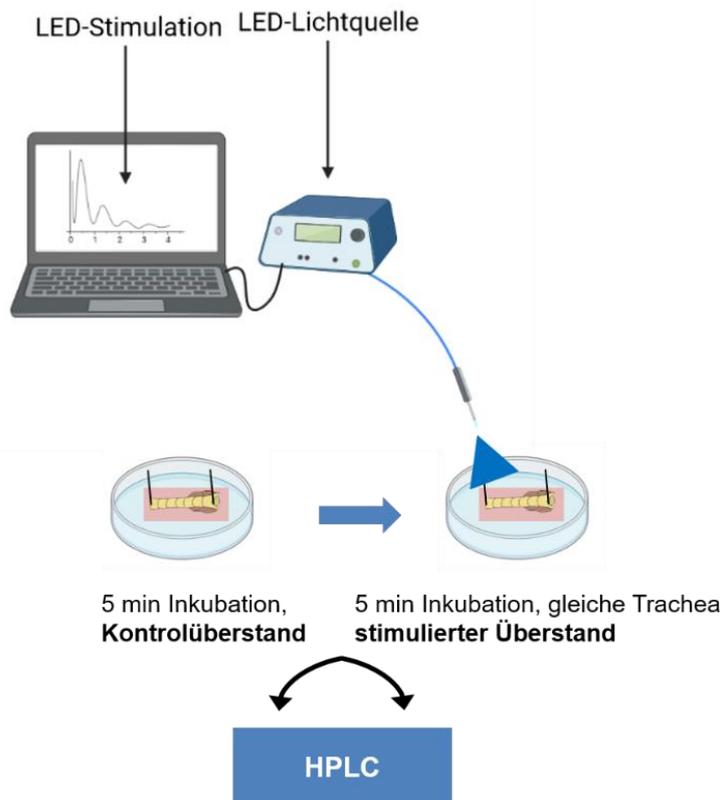
Für die Stimulation der Trachea wurde diese wie für die Whole-Mount-Präparation (Abschnitt 2.2.1.1) präpariert. Im Anschluss wurde die Trachea in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit HEPES-Puffer (Tab. 15) gewaschen. Anschließend wurde sie in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, in dem 500 µl HEPES-Puffer vorgelegt wurden, und für 15 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert (Kontrollüberstand). Im Anschluss wurde die Trachea mit einer Pinzette herausgenommen und entweder in ein Reaktionsgefäß mit HEPES-Puffer + 10 µM f-MKKFRW oder in ein Röhrchen ohne f-MKKFRW überführt und nochmals für 15 min inkubiert (stimulierter Überstand). Der Versuchsablauf ist schematisch in Abb. 25 dargestellt.



**Abbildung 25: Stimulation der Trachea durch f-MKKFRW für ACh-Konzentrationsmessungen.** Schematische Darstellung des Versuchsablaufs. Modifiziert aus Perniss et al. 2020b.

### 2.2.9.2 Stimulation durch LED

Für die Stimulation der Trachea wurde diese wie für die Whole-Mount-Präparation (Abschnitt 2.2.1.1) präpariert. Im Anschluss wurde diese in eine Petrischale, welche mit Sylgard ausgegossen war, überführt. Die Petrischale wurde auf eine Heizplatte (37°C) gestellt. Die Trachea wurde auf einer Wachsplatte mit Minuten aufgespannt, sodass die Epithelfläche nach oben zeigte. Im Anschluss wurde 200 µl HEPES-Puffer auf die Tracheaoberfläche pipettiert, für 5 min inkubiert und im Anschluss abgenommen (Kontrollüberstand). Darauffolgend wurde wieder 200 µl HEPES-Puffer auf die Tracheaoberfläche pipettiert und LED-Licht wie in Abschnitt 2.2.6.1 beschrieben für 2 min appliziert. Im Anschluss wurde die Trachea für 3 weitere min inkubiert. Die Kontrollversuche ohne LED-Stimulation wurden dementsprechend für 5 min inkubiert (stimulierter Überstand) (Abb. 26).



**Abbildung 26: LED-Stimulation der Trachea für ACh-Konzentrationsmessungen.** Schematische Darstellung des Versuchsablaufs.

### 2.2.10 ACh-Konzentrationsmessungen mittels HPLC

Die HPLC-Messungen wurden von Helene Lau aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Jochen Klein am Institut für Biochemie und Pharmazie der Goethe Universität Frankfurt durchgeführt. Hierzu wurden die trachealen Überstände (200 µl je Überstand) aus den Versuchen, welche in Abschnitt 2.2.9 beschrieben wurden, genutzt. Eine ausführliche Beschreibung der Methodik kann in den Publikationen (Lietsche et al. 2016; Perniss et al. 2020b) nachgelesen werden.

### 2.2.11 Messungen der $[Ca^{2+}]_i$ in Neuronen des JNC und M3-Reporterzellen

#### 2.2.11.1 Beschichtung von Deckgläschen mit Laminin und Poly-L-Lysin

Sowohl isolierte Neurone aus dem JNC als auch die M3R-Reporterzellen wurden auf Glasdeckgläschen mit einem Durchmesser von 12 mm ausgesät. Diese wurde zuvor mit einer Mischung aus Laminin und Poly-L-Lysin beschichtet. Dazu wurden die Deckgläschen einzeln mit einer Pinzette zuerst in Aceton getaucht, dann in dest. Wasser und abschließend in 100 % EtOH und danach in einem autoklavierten Glasgefäß auf einem sterilem Filterpapier zum Trocknen ausgelegt. Danach wurden die Deckgläschen bei 180°C für 3 h gebacken, um diese zu sterilisieren. Im Anschluss wurden die Deckgläschen in eine feuchte Kammer überführt und

mit je 150 µl einer Mischung aus Poly-L-Lysin (1:2) und Laminin (1:100) in Ampuwa bedeckt. Die Deckgläschen inkubierten anschließend über Nacht bei Raumtemperatur. Am nächsten Tag wurden die Deckgläschen 4x mit Ampuwa gewaschen und anschließend getrocknet und bis zu Verwendung in einem sterilen Glasgefäß bei Raumtemperatur gelagert.

### 2.2.11.2 Isolation von Neuronen des JNC

Der Isolationsprozess ist in Abb. 27 schematisch dargestellt. Der JNC wurde nach der Präparation (Abschnitt 2.2.1.4) zunächst mit einer Federschere mechanisch zerkleinert und darauffolgend für 30 min in einer Dissoziationslösung bestehend aus 1 ml HBSS versetzt mit je 2 mg Dispase und Kollagenase A bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden die JNC-Stücke mit einer Glaspipette mit einer Öffnung von ca. 3 mm 10-mal angesaugt und nochmals für 15 min bei 37°C inkubiert, darauffolgend mit einer Glaspipette mit einer Öffnung von ca. 2 mm 10-mal angesaugt und erneut inkubiert und zuletzt mit einer Glaspipette mit einer Öffnung von ca. 1 mm 10-mal angesaugt und danach in ein 15 ml-Falcon Röhrchen mit 10 ml L-15-Medium versetzt mit 5% FCS (Fetales Kälberserum) und 1% Penicillin und Streptomycin überführt. Das Ansaugen der JNC-Stücke in Glaspipetten mit kleiner werdenden Öffnungen führte zu einer weiteren mechanischen Vereinzelung. Anschließend wurden die JNC-Stücke bei 3000 rpm für 3 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet in L-15-Medium resuspendiert, dieser Schritt wurde 2x wiederholt. Abschließend wurde das Pellet in 500 µl L-Medium gelöst und je 10 µl auf vorbereitete Deckgläschen (Abschnitt 2.2.11.1) gegeben. Diese wurden zuvor in eine 24-Well Platte vorgelegt. Die Deckgläschen inkubierten für 2 h im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. In dieser Zeit hefteten sich die isolierten Neurone an die Deckgläschen, tote Zellen oder Immunzellen dagegen sind nicht adhärent. Anschließend wurden 500 µl L-15-Medium auf die Deckgläschen gegeben und wieder abgenommen. Danach wurde nochmals 500 µl L-15-Medium dazugeben und die Neurone über Nacht inkubiert.

## 2. Material und Methoden

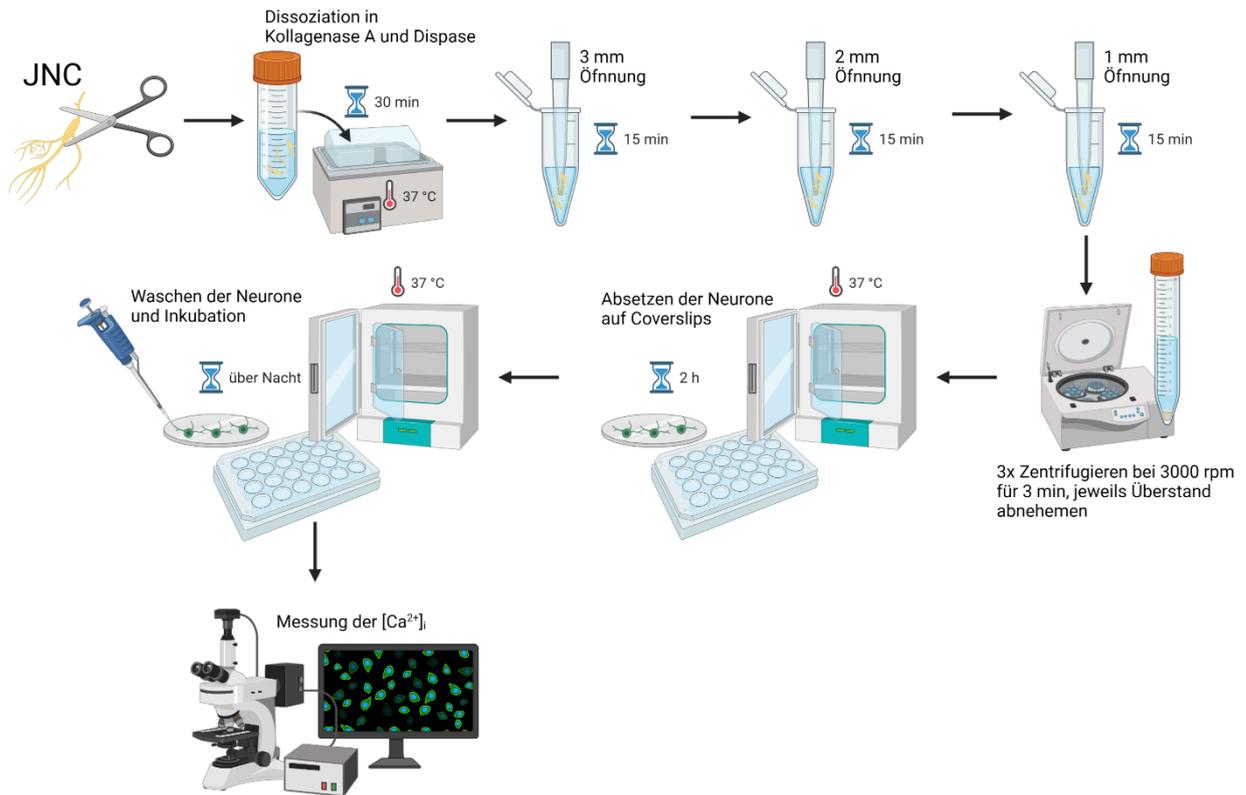


Abbildung 27: Schematische Darstellung der Isolation von Neuronen aus dem JNC.

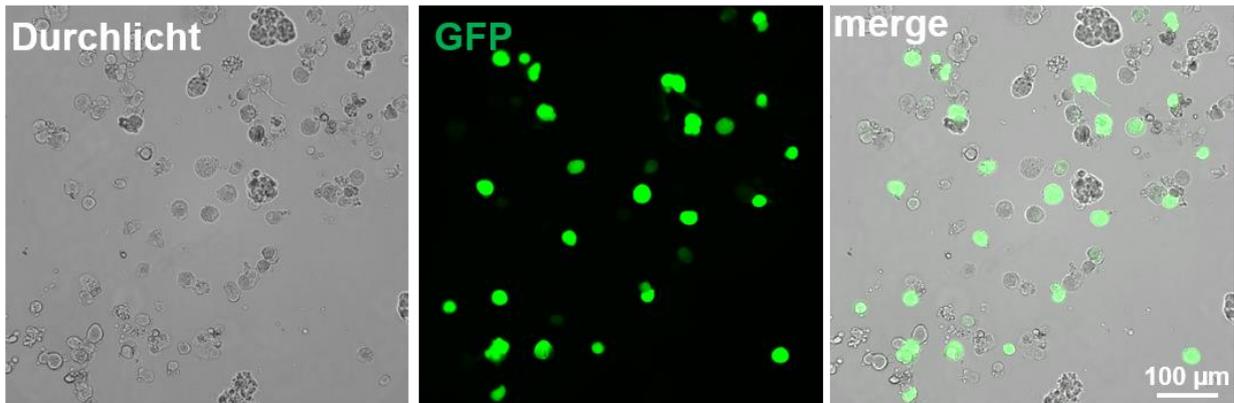


Abbildung 28: Isolierte Zellen aus dem JNC von  $\alpha 3$ -GFP-Mäusen. Neurone, welche nAChR $\alpha 3$  exprimieren, sind GFP-positiv. Modifiziert aus Perniss et al. 2020b.

### 2.2.11.3 Vorbereitung der M3-Reporterzellen

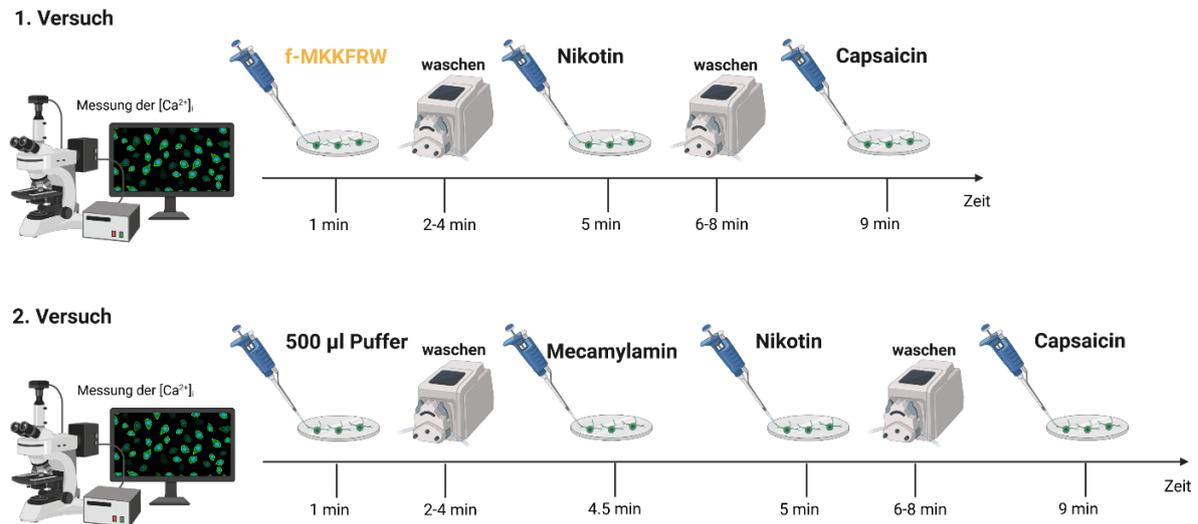
Die CHO-K1-Zelllinie hat ihren Ursprung in Epithelzellen aus dem Ovar von chinesischen Hamstern. Diese Zelllinie wurde so verändert, dass diese den muskarinischen Acetylcholinrezeptor M3 der Ratte überexprimiert. Die Zelllinie wurde von ATCC (American Type Culture Collection) bestellt und hat die Identifikationsnummer M3WT4 (CRL-1981). Die Zellen wurden am Versuchstag frisch aufgetaut und auf Deckgläschen ausgesät, welche zuvor beschichtet wurden (Abschnitt 2.2.11.1). Dazu wurden die Zellen sofort nach dem Auftauen in 10 ml HAMs F12-K Medium mit 10 % FCS und jeweils 1 % Penicillin und Streptomycin gelöst. Danach wurden die Zellen für 5 min bei 3000 rpm zentrifugiert und neues Medium hinzugegeben, die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt und je Deckgläschen ca. 10.000 Zellen ausgesät (ca. 200 µl je Deckgläschen). Die Deckgläschen wurden für 1 h in 24 Well-Platten bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> im Inkubator inkubiert und anschließend mit Medium bedeckt.

### 2.2.11.4 Messung der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in Neuronen des JNC

Die isolierten Neurone wurden nach der Vereinzelung (Abschnitt 2.2.11.2) und Inkubation über Nacht mit frischem L-15-Medium gewaschen und anschließend für 30-90 min in 8 µM Fura-2AM (gelöst in DMSO und verdünnt in Medium) inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläschen in ein Delta-T-Dish gelegt und mit einem Gewicht beschwert; dieses verhinderte das Verrutschen der Deckgläschen durch die Perfusion oder Zugabe der Pharmaka. Anschließend wurde das Deckgläschen mit 37°C warmen Locke-Puffer (Tab. 16) superfundiert. Der Locke-Puffer wurde in einem Wasserbad bei 37°C vorgewärmt und während der gesamten Versuchsdauer mit Carbogen begast. Für die Messungen wurde ein 20x Eintauchobjektiv verwendet. Es wurde jede Sekunde ein „Bild“ aufgenommen, wobei jedes „Bild“ aus zwei Einzelbildern bestand, welche bei einer Anregungswellenlänge von 340 nm und 380 nm aufgenommen wurden. Freies Fura-2AM wird bei 380 nm angeregt, gebundenes Fura-2AM bei 340 nm. Es wurde jeweils die Fluoreszenzintensität bestimmt und ein Verhältnis (340/380) aus diesen gebildet.

Vor jeder Messung wurde ein Bild des zu untersuchenden Ausschnitts im FITC-Filter (460-490 nm, Anregung) aufgenommen, um GFP-positive Zellen zu identifizieren (Abb. 28). Für die Messungen wurde die Perfusion unterbrochen und nach 1 min erfolgte die Applikation der ersten Substanz, z.B. f-MKKFRW (10 µM Endkonzentration). Die Substanz wurde dazu immer in 500 µl Locke-Puffer verdünnt und seitlich am Objektiv langsam hinzugegeben. Zuvor wurde der Ein- und Auslauf so eingestellt, dass sich in der Kammer 2 ml Puffer befanden. Die Konzentration der Substanz wurde auf das Endvolumen von 2,5 ml berechnet. Nach der Applikation der Substanz wurden für 30 s Bilder aufgenommen und im Anschluss die Perfusion für 2 min angeschaltet. Im Anschluss wurde die Perfusion wieder abgeschaltet und nach 30 s

die nächste Substanz appliziert, z.B. Nikotin (100  $\mu\text{M}$  Endkonzentration); 30 s später wurde die Perfusion wieder für 2 min angeschaltet. Zum Abschluss jeder Messung erfolgte die Applikation von Capsaicin (300 nM) als Lebendkontrolle. In einer zweiten Versuchsserie wurde vor der Applikation von Nikotin der nAChR-Antagonist Mecamylamin (100  $\mu\text{M}$ ) appliziert. Der Versuchsablauf ist in Abb. 29 schematisch dargestellt.



**Abbildung 29: Schematische Darstellung des Versuchsablaufes der Messung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  von JNC-Neuronen.**

Für die Auswertung der Versuche wurde die Baseline der Fura-2-Ratio bestimmt, dazu wurde der Mittelwert aus 15 Bildern (15 s) vor der Applikation des jeweiligen Pharmakons bestimmt. Im Anschluss wurde die prozentuale Veränderung, verursacht durch die Applikation eines Pharmakons, im Vergleich zur Baseline ermittelt ( $\Delta\text{Fura-2-Ratio}$  [%]).

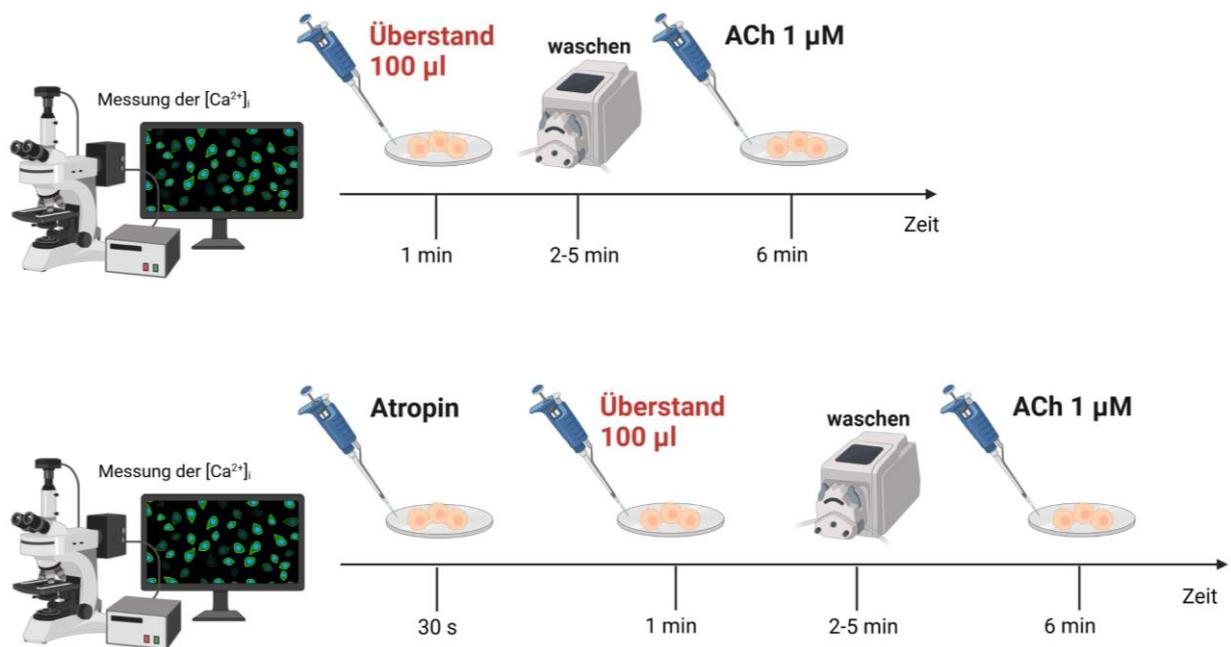
Es wurden insgesamt 2 voneinander unabhängige Experimente durchgeführt; jeweils wurden die Neurone von 3-Tieren isoliert und analysiert. Im Anschluss wurden die Daten gepoolt dargestellt. Es wurden nur Zellen ausgewertet, welche ein GFP-Signal aufwiesen und auf entweder Nikotin und/oder Capsaicin mit einem Anstieg von mehr als 20% der Fura-2-Ratio im Vergleich zur Baseline reagierten.

#### 2.2.11.5 Messung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in M3-Reporterzellen

Die Messung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in M3-Reporterzellen fand in Zusammenarbeit mit Lucas Delventhal vom Institut für Anatomie und Zellbiologie, JLU Gießen, statt, dabei übernahm Herr Delventhal teilweise die Auswertung der Versuche und assistierte bei den Messungen. Die M3-Reporterzellen wurden nach dem Absetzen mit frischem HAMS F12-K Medium gewaschen und anschließend für 30-90 min in 8  $\mu\text{M}$  Fura-2 AM (gelöst in DMSO und verdünnt in Medium) inkubiert. Die Messung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie zuvor beschrieben

für die JNC-Neurone. Die Baseline wurde wieder aus dem Mittelwert der 15 Werte vor der Applikation des Stimulus berechnet. Am Ende jeder Messung wurde ACh ( $1 \mu\text{M}$ ) appliziert; nur Zellen, welche zuvor auf einen Stimulus oder ACh am Ende mit einer Veränderung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  von mehr als 10% reagierten, wurden ausgewertet. Um zu überprüfen, welche ACh-Konzentration zu einem Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in den Reporterzellen führte, wurde für jede Konzentration ein neues Deckgläschen verwendet. Bei der repetitiven Applikation von ACh wurde zwischen jeder Gabe ein Waschschrift von 2 min durchgeführt.

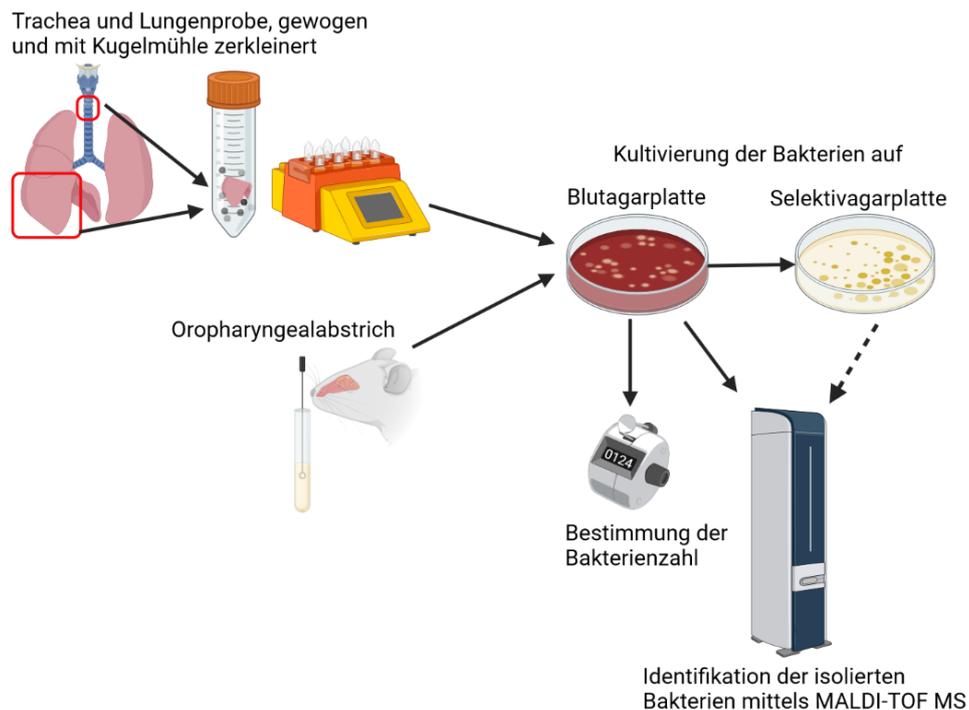
Für die Untersuchung der trachealen Überstände wurden die Deckgläschen für 1 min gemessen, danach erfolgte die Applikation des Überstandes ( $100 \mu\text{l}$ ). Im Anschluss wurde für 1 min gemessen und darauffolgend das Deckgläschen mit Locke-Puffer für 3 min perfundiert. Abschließend erfolgte die Gabe von ACh ( $1 \mu\text{M}$ ). Für die Versuche mit Atropin ( $1 \mu\text{M}$ ) wurde dieses 30 s vor der Applikation des Überstandes hinzugegeben. Der Versuchsablauf ist in Abb. 30 schematisch dargestellt. Jeder Überstand wurde mindestens an zwei Deckgläschen in voneinander unabhängigen Experimenten getestet.



**Abbildung 30: Schematische Darstellung des Versuchsablaufes der Messung von M3-Reporterzellen.**

### 2.2.12 Nachweis und Kultivierung von *B. pseudohinzii*

Um zu untersuchen, ob und in welchem Ausmaß die Tiere der Linie Trpm5-Ko durch das Bakterium *B. pseudohinzii* besiedelt waren, wurden Proben dieser Tiere mikrobiologisch untersucht. Dazu wurde nach dem Töten des Versuchstieres ein Oropharyngealabstrich durchgeführt und der proximale Teil der Trachea (2-3 Ringe) sowie der kaudale Lappen der rechten Lunge entnommen. Die Gewebeproben wurden anschließend in einer Kugelmühle zerkleinert und an Frau Nadine Schmidt vom Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere der JLU Gießen übergeben. Anschließend wurden die Proben auf Blutagarplatten ausgestrichen und Kolonien, welche einen für Bordetellen typischen Phänotyp aufwiesen, gezählt. Zudem wurden einzelne Kolonien auf Selektivagarplatten (Blutagar mit Cephalexin 20 mg/ml, *Nutrient Broth No. 2* mit Neomycin 2 mg/ml und Bacitracin 3 mg/ml und Gassner-Agarplatten) ausgestrichen. Die gewachsenen Kolonien wurden zusätzlich gepickt und per MALDI-TOF-MS (Matrix-Assistierte Laser-Desorption-Ionisierung (MALDI) mit der Flugzeitanalyse (engl. time of flight, TOF) freigesetzter Ionen zur Massenspektrometrie analysiert und die Bakterienspezies bestimmt und überprüft. Die Bakterienzahl wurde semiquantitativ bestimmt (Score 0 = keine Bakterien, Score 1 = 5-50 Bakterien, Score 2 = 50-200 Bakterien, Score 3 >200 Bakterien). Die Analyse erfolgte verblindet, so hatten die durchführenden Personen keine Kenntnisse über den Genotyp der Versuchstiere. Die genaue Methodik der Kultivierung und Bestimmung ist in (Perniss et al. 2018; Perniss et al. 2020b) beschrieben. Der schematische Ablauf ist in Abb. 31 dargestellt.



**Abbildung 31: Schematische Darstellung der Isolation und Kultivierung von *B. pseudohinzii*.**

### 2.2.13 Infektionsexperimente mit *S. pneumoniae*.

In diesen Versuchen wurden Mäuse intranasal mit dem Bakterium *S. pneumoniae* des Typs PN36 infiziert. Die Versuchsleitung lag dabei bei Prof. Dr. Martin Wirtzenrath und Frau Dr. Geraldine Nouailles von der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie der Charité Berlin. Die Versuchsplanung und Antragsstellung erfolgten in Zusammenarbeit mit Frau Prof. Dr. Gabriela Krasteva-Christ, Universität des Saarlandes, Homburg. Die Versuchstiere wurden ebenfalls von Frau Prof. Dr. Gabriela Krasteva-Christ zur Verfügung gestellt. Die Versuchsdurchführung erfolgte durch Dr. Sandra Wienhold und Alexander Perniss. Genehmigt wurden die Versuche durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin (Genehmigungsnummer G0266/11). Ich assistierte bei der Infektion der Tiere, übernahm das Monitoring der Tiere, euthanasierte die Tiere, entnahm die Proben für die histologischen Untersuchungen, führte die Bestimmung der CFU durch und untersuchte die Anzahl der SCCC. Die pathologische Untersuchung der Tiere erfolgte durch die Kolleginnen Dr. Kristina Dietert und Dr. Corinne Gurtner des Institutes für Veterinärpathologie der FU Berlin. Die angesetzte Versuchsdauer betrug 10 Tage nach Infektion. Die Versuche wurden mit Tieren der Linie Trpm5-DTA und Kontrolltieren durchgeführt. Als Kontrolltiere dienten, wie bei den PTS-Versuchen, Trpm5-IRES-CRE (Wt), verpaart mit R26:lacZbPAfloxDTA = Trpm5-DTA<sup>+/-</sup>). Für die Versuche wurden männliche und weibliche Tiere in einem Alter von 9-16 Wochen verwendet. Insgesamt wurden 18 Trpm5-DTA und 18 Kontrolltiere infiziert, ein Trpm5-DTA-Tier wurde aus der Auswertung entfernt, da in nachfolgenden Immunmarkierungen TRPM5<sup>+</sup>-Zellen im Trachealepithel beobachtet werden konnten. Es wurden zwei voneinander unabhängige Versuchsreihen durchgeführt. Ein Monitoring der Tiere fand alle 12 h statt. Dabei wurden sowohl das Körpergewicht als auch die Körpertemperatur kontrolliert. Eine Abnahme des Körpergewichts um mehr als 20% in Bezug auf das Ausgangsgewicht des Tieres und eine Körpertemperatur <35°C sowie ein stark vermindertes Allgemeinverhalten oder eine auffällige Atmung führten zu einer sofortigen Euthanasie des Tieres; die Überlebenszeit der Tiere wurde in Kaplan-Meier-Kurven dargestellt.

#### 2.2.13.1 Infektion der Versuchstiere

Zunächst wurden die Bakterien mit einer Impföse von einer bestehenden kolonisierten Columbia-Blutagarplatte (mit 5 % Schafsblut) frisch ausgestrichen und für 9–10 h bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden von dieser Platte einzelne Kolonien in das Anzuchtmedium (18 ml THY-Nährlösung und 2 ml FCS) überführt, darauffolgend wurde die Bakterienkultur solange kultiviert, bis diese eine OD (optische Dichte) von 0,3-0,4 erreichte. War dies der Fall, wurde die Bakterienkultur für 10 min bei 2000 g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet resuspendiert. Anschließend wurde die OD bestimmt, dabei entsprach eine OD von 0,1 einer Bakterienanzahl von 1 x 10<sup>8</sup> CFU/ml. Anschließend wurde

so viel PBS hinzugegeben, dass die OD  $\sim 0,01$  betrug, dies entsprach einer CFU/ml von  $10^7$ . Von dieser Bakterienkultur wurde jedem Versuchstier 20  $\mu$ l verabreicht, dies sollte einer CFU von  $2,5 \times 10^5$  pro Tier entsprechen. Nach der Infektion der Tiere wurden 20  $\mu$ l der Bakterienkultur in verschiedenen Verdünnungen auf Columbia-Blutagarplatten ausgestrichen und die eigentliche Infektionsdosis bestimmt bzw. überprüft.

Für die Infektion wurden die Tiere gewogen und eine intraperitoneale Injektionsnarkose durchgeführt. Hierzu wurde jedem Tier 8 mg / 100 g Körpergewicht Ketamin und 2,5 mg/100 g Körpergewicht Xylazin in NaCl-Lösung (0,9 %) injiziert. Zum Schutz der Hornhaut der Augen wurde den Mäusen Thilo-Tears Augengel aufgetragen. Das Erreichen der gewünschten Narkosetiefe wurde überprüft und die Tiere in eine spezielle Halterung unter der Sterilbank verbracht. Dabei wurden die Tiere an den oberen Schneidezähnen fixiert und in jedes Nasenloch 10  $\mu$ l der Bakterienkultur mit einer Pipette vorsichtig appliziert. Kontrolltiere erhielten je Nasenloch 10  $\mu$ l PBS-Lösung. Die Tiere wurden für 2-3 Minuten in dieser Position gehalten und anschließend in die Käfige zurückgebracht. Die Aufwachphase wurde in regelmäßigen Abständen überwacht und ein Unterkühlen der Tiere durch eine Rotlicht-Lampe verhindert. Der Versuchsablauf ist in Abb. 32 schematisch dargestellt.

### 2.2.13.2 Tötung der Versuchstiere und Probenentnahme

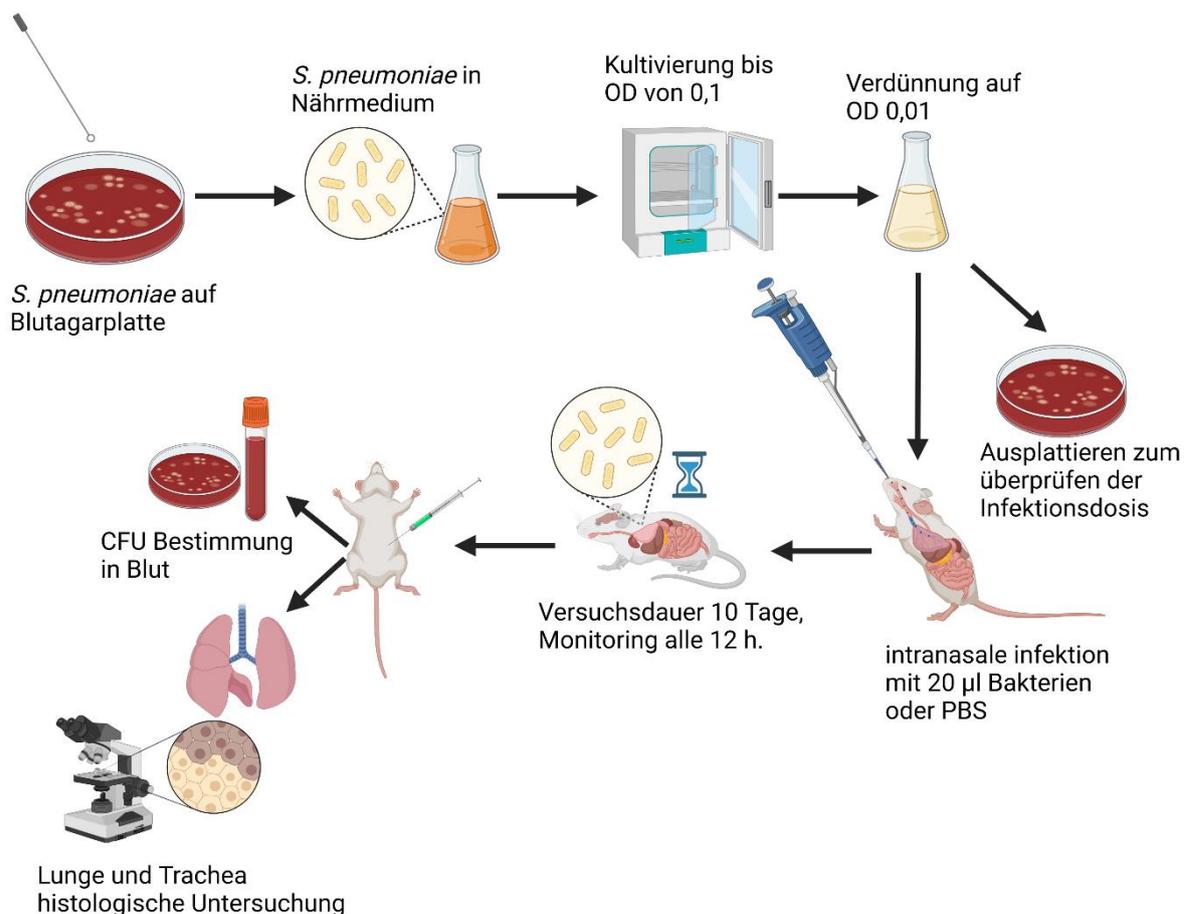
Die Versuchsdauer wurde auf 10 Tage festgelegt. Wurde diese erreicht, erfolgte die Tötung der Tiere und Probenentnahme. Dazu wurde das Tier mittels einer intraperitonealen Injektion von 16 mg / 100 g Körpergewicht Ketamin und 7,5 mg/100 g Körpergewicht Xylazin in NaCl-Lösung (0,9 %) narkotisiert. Nach dem Erreichen einer adäquaten Narkosetiefe (Ausbleiben des Zwischenzehenreflexes) wurde das Tier unter die Sterilbank verbracht und das Abdomen eröffnet. Mittels einer 1 ml Spritze und einer 27 G Kanüle wurde Blut aus der *Vena cava inferior* entnommen und in ein mit EDTA versetztes Probenröhrchen überführt. Im Anschluss erfolgte die Präparation der Lunge und Trachea. Hierzu wurde der Brustkorb eröffnet und die Lunge entnommen, die Trachea wurde zuvor kurz unterhalb der Bifurkation abgetrennt und separat weiterverarbeitet. Die Gewebe wurden in 4% PFA über Nacht fixiert. Die Lungen wurden für eine histologische Auswertung an Dr. Kristina Dietert und Dr. Corinne Gurtner vom Institut für Veterinär-Pathologie der FU Berlin übergeben. Die Trachea wurde von mir in Paraffin eingebettet und 5  $\mu$ m dicke Gewebeschnitte erstellt. Im Anschluss erfolgte eine Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen TRPM5.

### 2.2.13.3 Bestimmung der CFU im Blut

Um die Anzahl der Bakterien im Blut zu bestimmen, wurde Blut pur und in den Verdünnungen 1:10, 1:100 und 1:1000 auf Columbia Blutagarplatten mit 5 % Schafsblut ausgestrichen und über Nacht bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Bakterien wurden manuell gezählt und die Bakterienzahl anschließend in CFU/ml angegeben.

### 2.2.13.4 Histopathologische Untersuchungen

Die histopathologische Auswertung der Lungen wurde von Dr. Kristina Dietert und Dr. Corinne Gurtner vom Institut für Veterinärpathologie der FU Berlin durchgeführt. Dazu wurden die Lungen in Paraffin eingebettet und 5 µm dicke Schnitte hergestellt. Diese wurden anschließend mit Hämatoxylin-Eosin angefärbt und je Lunge drei repräsentative Schnitte ausgewertet. Die Antikörper-Markierung gegen *S. pneumoniae* wurde ebenfalls von Frau Dr. Kristina Dietert durchgeführt und ausgewertet. Es erfolgte eine semiquantitative Auswertung, welche bereits mehrfach zum Einsatz kam und publiziert wurde (Dietert et al. 2017; Berger et al. 2018; Schauer et al. 2017).



**Abbildung 32: Schematische Darstellung der Infektionsexperimente mit *S. pneumoniae***

### 2.2.14 Bioinformatische Analyse

Um zu untersuchen, in welchen Mikroorganismen die eingesetzten Peptide natürlich vorhanden sind, wurde die bioinformatische Datenbank UniProt.org (*universal protein database*) verwendet. Anschließend wurden unter den identifizierten Mikroorganismen diejenigen Bakterien herausgesucht, welche Atemwegsinfektionen beim Menschen oder Mäusen hervorrufen können.

### 2.2.15 Datenanalyse und statistische Auswertung

Die Bearbeitung von Bildern, z.B. Immunfluoreszenz oder PCR-Ergebnissen, fand mit dem Programm ImageJ (Version 1.8.0\_172) statt. Es wurde stets das gesamte Bild verändert, so wurde falls nötig der Kontrast oder die Helligkeit angepasst.

Die Ergebnisse der Versuche wurden, wenn nicht anders gekennzeichnet, als Mittelwert (MW)  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm Prism (Version 7), ebenso die Erstellung der Abbildungen, zusätzlich wurde das Programm Inkscape (Version 0.92.3) für die Erstellung der Abbildungen verwendet. Die Schemata wurden unter Verwendung von BioRender (<https://app.biorender.com>) und Adobe Illustrator (<https://adobe.com/de/products/illustrator>) erstellt. Die Daten wurden auf Normalverteilung getestet, hierzu wurde die möglichst größte Stichprobe mit dem D'Agostino-Pearson omnibus Test auf Normalverteilung hin überprüft. Wurde eine Normalverteilung der Daten ausgeschlossen, so wurde bei voneinander unabhängigen Proben ein Mann-Whitney-U Test durchgeführt. Lag eine Normalverteilung vor, so wurde der ungepaarte t-Test angewendet. Wenn voneinander abhängige Daten, z.B. Werte vor und nach einer Stimulation, untersucht wurden, kam entweder bei einer Normalverteilung der Daten der gepaarte t-Test oder im Falle einer Nicht-Normalverteilung der Daten der Wilcoxon-Rangsummentest zum Einsatz. Mehrere Gruppen, die in Bezug auf ein Merkmal verglichen werden sollten, wurden mit einer einfraktionellen Varianzanalyse (One-Way-ANOVA) analysiert (Gewichte der Versuchstiere im Infektionsversuch). Wurden Häufigkeiten miteinander verglichen, z.B. das Vorliegen einer Infektion durch *B. pseudohinzii*, so wurde der Chi-Quadrat-Test zur Datenanalyse herangezogen. Die Analyse der Kaplan-Meier-Kurven (Überlebenszeitanalyse) erfolgte durch Anwendung des Mantel-Cox-Testes. Ein Unterschied zwischen zwei oder mehreren Gruppen wurde als statistisch signifikant bezeichnet, wenn  $p < 0,05$  vorlag.

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Chemosensorische Epithelzellen in der Trachea der Maus

#### 3.1.1 Abgrenzung solitärer neuroendokriner Zellen von SCCC und Lokalisation im

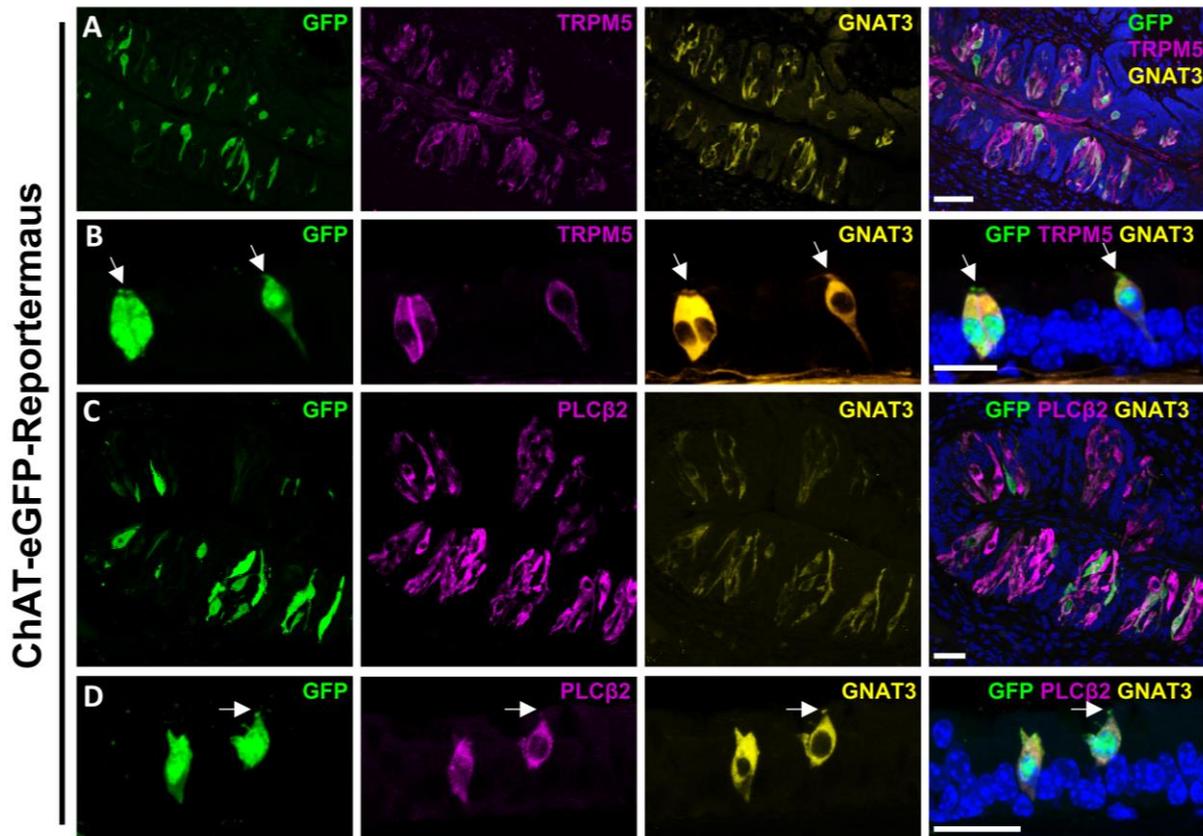
##### Trachealepithel

Die epithelialen SCCC in der Trachea der Maus exprimieren verschiedene Geschmacksrezeptoren und Komponenten, zu deren Signalkaskade z.B. PLC $\beta$ 2, TRPM5 und GNAT3 gehören, welche typischerweise in den Geschmackszellen der Zunge zu finden sind (Höfer et al. 1996; Krasteva et al. 2011). Zudem wurde die Expression des Enzyms ChAT, welches für die Synthese von ACh zuständig ist, in den SCCC nachgewiesen (Krasteva et al. 2011). Diese Befunde sollten zunächst validiert werden, da diese die Grundlage der vorliegenden Arbeit bilden.

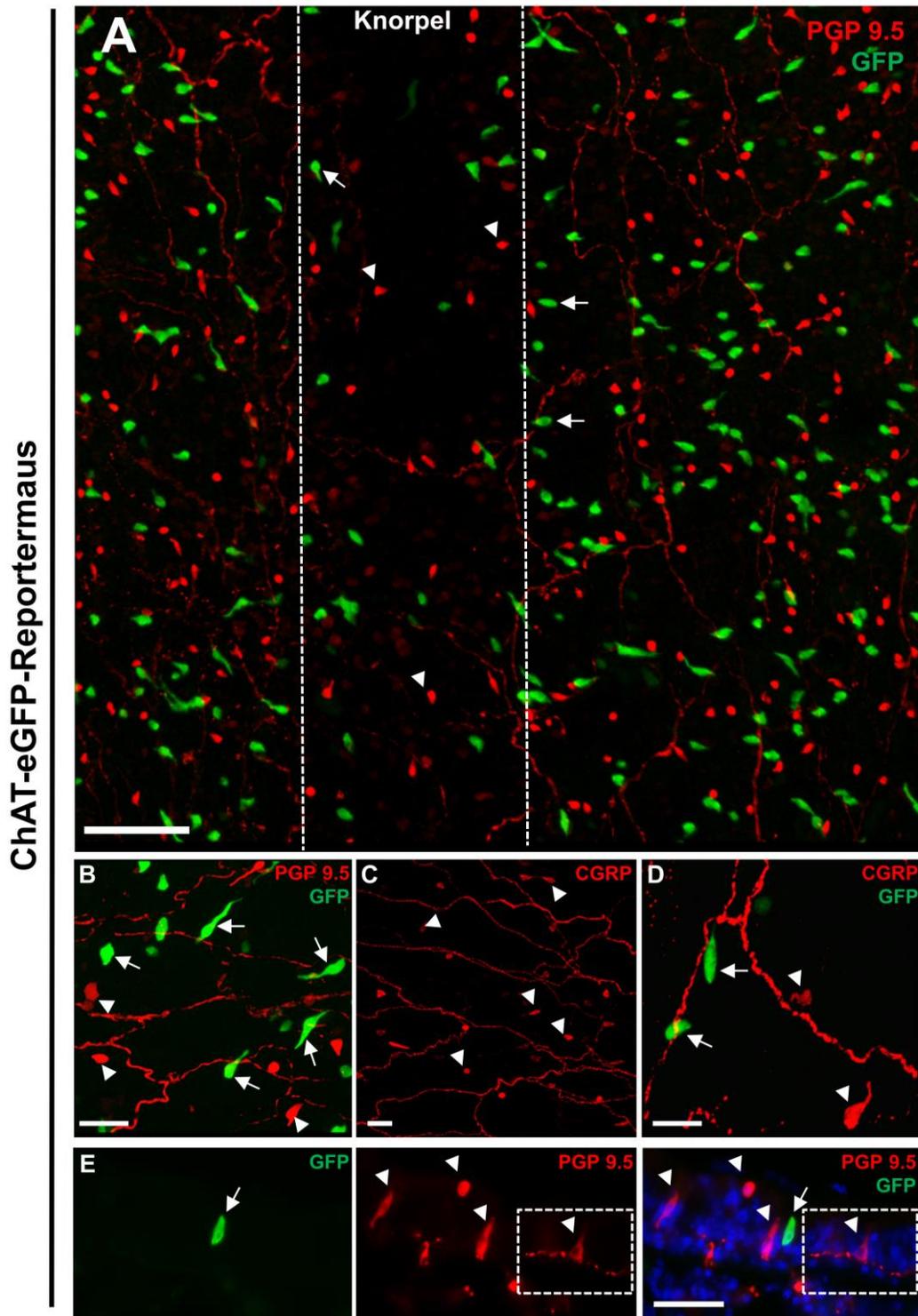
Hierzu wurden Gefrierschnitte von Tracheen und Zungen von *ChAT*-eGFP-Reportermausen angefertigt und mittels immunhistochemischen Methoden untersucht. Dabei dienten die Geschmackszellen der Zunge, welche als Geschmacksknospen organisiert sind, als Positivkontrolle. Sowohl in der Zunge als auch in der Trachea konnten Zellen mit Antikörpern gegen eGFP (ChAT), TRPM5, GNAT3 und PLC $\beta$ 2 markiert werden. Dabei konnte eine Co-Expression der Proteine eGFP, TRPM5 und GNAT3 sowie eine Co-Expression von eGFP, PLC $\beta$ 2 und GNAT3 in Epithelzellen der Trachea und Zellen der Zunge beobachtet werden (Abb. 33). Die fluoreszenzmarkierten Epithelzellen der Trachea wiesen eine polare Organisation auf. So saßen diese basolateral der Basallamina auf und wiesen apikal einen stark markierten Punkt an der Spitze der Zelle auf, welcher in das Lumen der Trachea ragt (Abb. 33B und D).

Einen weiteren Zelltyp im Trachealepithel der Maus stellt die solitäre neuroendokrine Zelle (PNEC) dar. Diese Zellen können anhand der Expression von PGP9.5 und/oder CGRP identifiziert werden (Thompson et al. 1983; Cadieux et al. 1986). Wie in Abb. 34 dargestellt, waren ChAT-eGFP-positive SCCC nicht PGP9.5- bzw. CGRP-positiv und konnten daher als eigenständiger Zelltyp von neuroendokrinen Zellen abgegrenzt werden. Ein quantitativer Unterschied in der Anzahl von PNEC und SCCC konnte mit Antikörpern gegen PGP9.5 (PNEC) und GFP (ChAT-eGFP, SCCC) in *Whole-Mount*-Präparaten nicht festgestellt werden ( $p=0,0649$ ; Mann-Whitney Test;  $n=6$ ; Appendix Tab. 1). So lag in der Trachea von adulten Tieren die durchschnittliche Dichte von SCCC bei  $314 \pm 50$  Zellen pro  $\text{mm}^2$  und bei PNEC bei  $224 \pm 10$  Zellen pro  $\text{mm}^2$ . Es konnte jedoch ein Unterschied in der Zelldichte sowohl von SCCC als auch PNEC im Bereich zwischen den Knorpelspangen gegenüber dem Bereich über den Knorpelspangen der Trachea beobachtet werden. Somit befanden sich mehr Zellen in den

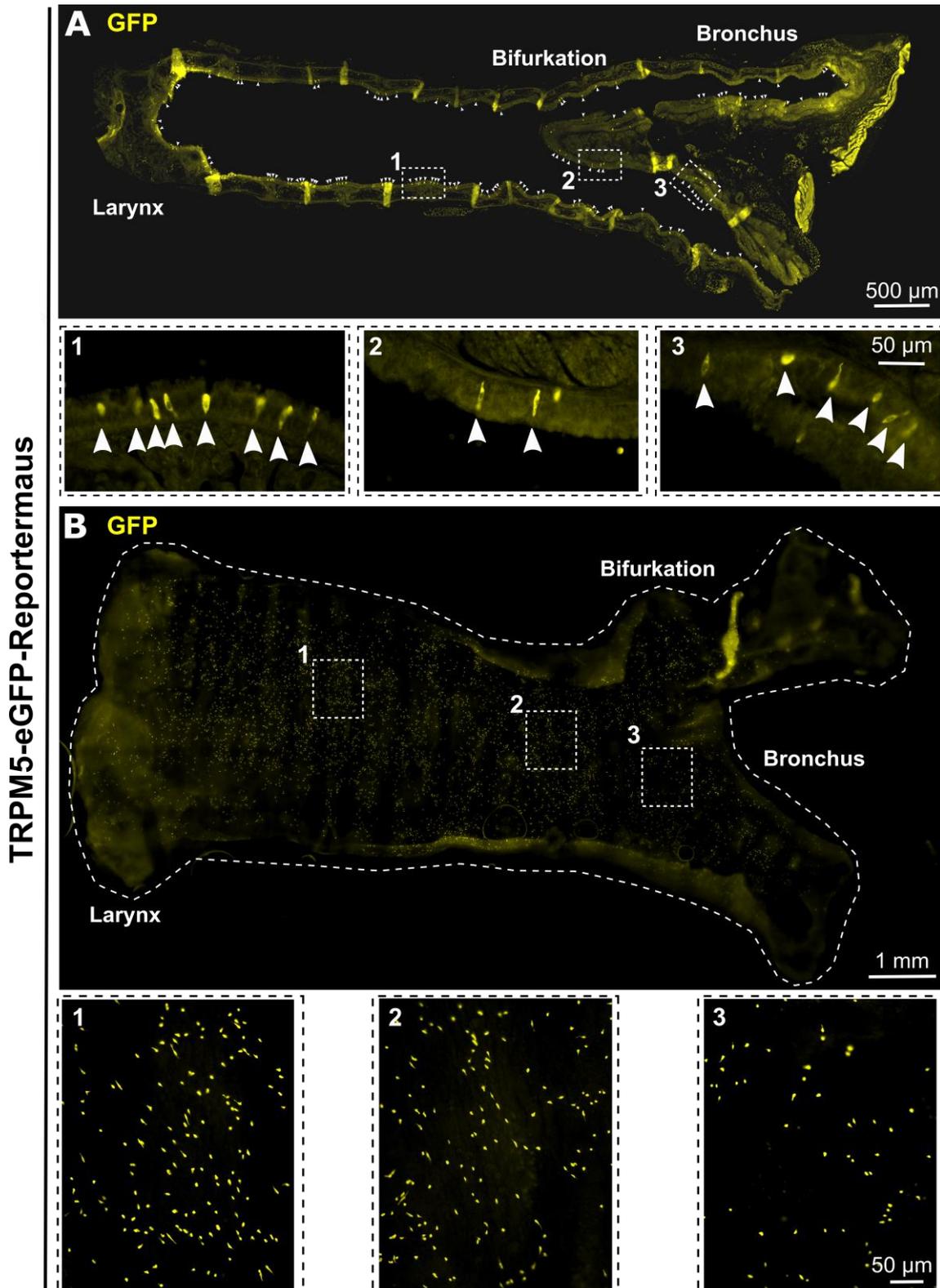
Bereichen zwischen den Knorpelspangen als über dem Knorpel (Abb. 34 und 35). Dies deckt sich mit den Beobachtungen von Krasteva und KollegInnen (Krasteva et al. 2011). Sensorische Nervenfasern durchziehen das Epithel und waren sowohl immunreaktiv für CGRP als auch für PGP9.5 (Abb. 34). Ein Anteil der PNEC (Abb. 34) sowie der SCCC stand in Kontakt zu sensorischen Nervenfasern (Krasteva et al. 2011). Die Anzahl der SCCC war kranial im Bereich des Larynx am höchsten und nahm in Richtung Bifurkation immer weiter ab, so dass nur noch vereinzelt SCCC in den Hauptbronchien gefunden werden konnten (Abb. 35).



**Abbildung 33: SCCC sind immunreaktiv für Proteine der Geschmackstransduktionskaskade. A-D:** IHC von Zungen (A, C) und Tracheen (B, D) von *ChAT*-eGFP-Reportermausen. CLSM, Maximumintensitätsprojektion von 20-63 Schnitten mit einer optischen Schnittdicke von jeweils 1-3  $\mu\text{m}$ . **A, C:** Zellen der Geschmacksknospen der Zunge sind immunreaktiv gegen eGFP (ChAT), PLC $\beta$ 2, GNAT3 und TRPM5. **B:** Solitäre Zellen im Epithel der Trachea sind immunreaktiv gegen eGFP (ChAT), TRPM5 und GNAT3. **D:** Solitäre Zellen im Epithel der Trachea sind immunreaktiv gegen eGFP (ChAT), PLC $\beta$ 2 und GNAT3. **B, D:** Die Spitze der Zellen erreicht das Lumen der Trachea (Pfeile). Kernfärbung mit DAPI. Maßstabsbalken: **A-D:** 20  $\mu\text{m}$ .



**Abbildung 34: Chemosensorische Epithelzellen der Trachea der Maus. A-E:** IHC an Tracheen von *ChAT*-eGFP-Mäusen. SCCC sind eGFP-positiv (Pfeile), PNEC und sensorische Nervenfasern sind PGP9.5- (**A, B, E**) und CGRP-positiv (**C, D**); (PNEC: Pfeilspitzen). **A:** Die Dichte von epithelialen chemosensorischen Zellen sowie Nervenfasern ist zwischen den Knorpelspangen höher als über dem Knorpel. **E:** Die Spitze der chemosensorischen Zellen erreicht das Lumen der Trachea (Pfeil). PNEC stehen in engem Kontakt zu PGP 9.5-positiven Nervenfasern (Box). **A-D:** CLSM, Maximumintensitätsprojektion von 20-63 Schnitten mit einer optischen Schnittdicke von jeweils 1-3  $\mu\text{m}$ . **E:** Fluoreszenzmikroskopie, Kernfärbung mit DAPI, Falschfarbendarstellung. **E:** Modifiziert aus Mahmoud et al. 2021. Maßstabsbalken: **A, E:** 50  $\mu\text{m}$ ; **B-D:** 20  $\mu\text{m}$ .



**Abbildung 35: Verteilung der SCC in der Trachea. A-B:** IHC von Tracheen von *TRPM5-eGFP*-Mäusen, eGFP-Signal verstärkt mittels Antikörper. Aufgenommen mit Fluoreszenzmikroskop Olympus BX51 in 20x Objektivvergrößerung und automatisierter Zusammensetzung der Einzelbilder, Falschfarbendarstellung. **A:** Longitudinalschnitt, Pfeile markieren die Position von eGFP-positiven Zellen. **B:** *Whole-mount*-Präparation. Die Gesamfläche der Trachea ist umrandet.

## 3.2 Charakterisierungen der eingesetzten Mauslinien

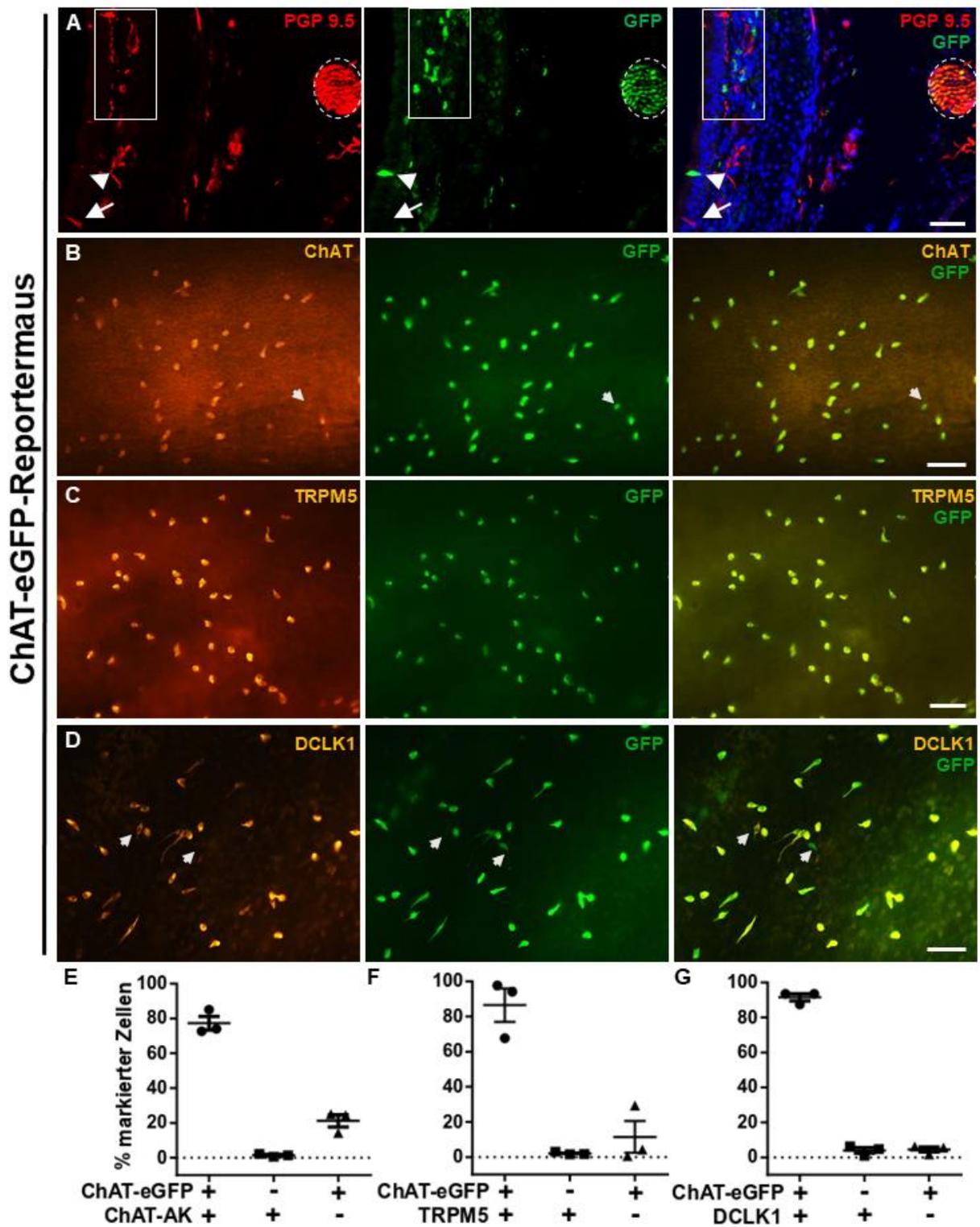
### 3.2.1 Reportermauslinien

Da im weiteren Verlauf dieser Arbeit verschiedene Reportermausstämme verwendet und unter anderem zur Quantifizierung von SCCC genutzt wurden, sollten diese zunächst validiert werden. Hierzu wurde die Expression des Reporterproteins, z.B. eGFP, unter dem Promotor des Zielproteins, z.B. ChAT, mit der immunhistochemischen Markierung mittels Antikörper gegen das Zielprotein verglichen. Zudem wurde überprüft, ob eine Co-Expression mit Proteinen der Geschmackstransduktionskaskade vorlag.

#### 3.2.1.1 *ChAT*-eGFP

SCCC exprimieren das Enzym ChAT (Krasteva et al. 2011) (Abb. 33 und 36). In der Trachea waren jedoch auch cholinerge Nervenfasern sowie eine Subpopulation von Immunzellen ChAT- bzw. GFP-immunreaktiv (Abb. 36). Diese Immunzellen waren subepithelial lokalisiert. Dabei handelt es vermutlich um Lymphozyten, welche im Rahmen eines entzündlichen Geschehens in das Gewebe immigriert sind oder im geringen Maße auch ohne vorhandenes Infektionsgeschehen auftreten können. Zur genaueren Charakterisierung der *ChAT*-eGFP-Reportermaus wurde untersucht, wieviel Prozent der eGFP-positiven Zellen im Epithel mit Antikörpern gegen ChAT, TRPM5 und DCLK1 markiert werden können. Hierzu wurden *Whole-Mount*-Präparate verwendet. Dabei wurde das endogene eGFP-Signal stets mit einem Antikörper gegen GFP verstärkt. Unter Verwendung von Antikörpern gegen ChAT zeigte sich, dass  $77 \pm 4\%$  der markierten Zellen im Epithel sowohl eGFP- als auch ChAT-immunreaktiv waren,  $21 \pm 4\%$  der untersuchten Zellen exprimierten eGFP, konnten jedoch mit dem Antikörper gegen ChAT nicht angefärbt werden. Zudem waren  $1 \pm 0,5\%$  der Zellen nur ChAT-Immunreaktiv und nicht eGFP-Immunreaktiv (n=3; Abb. 36E; Appendix Tab. 2). Dagegen wiesen  $87 \pm 9\%$  der markierten Zellen eine Immunreaktivität gegen TRPM5 und eGFP auf,  $2 \pm 0,4\%$  der Zellen waren nur TRPM5-immunreaktiv und  $11 \pm 9\%$  der Zellen nur eGFP-immunreaktiv (n=3; Abb. 36F; Appendix Tab. 3). Unter Verwendung von Antikörpern gegen DCLK1 konnten  $91 \pm 2\%$  der Zellen doppelt markiert werden,  $4 \pm 2\%$  der markierten Zellen waren nur DCLK1-immunreaktiv und  $5 \pm 1\%$  der Zellen nur eGFP-immunreaktiv (n=3; Abb. 36G; Appendix Tab. 4).

Abschließend lässt sich aus diesen Ergebnissen schlussfolgern, dass sich sowohl TRPM5 als auch DCLK1 als Marker dazu eignen, um die Anzahl von ChAT-positiven SCCC zu bestimmen.

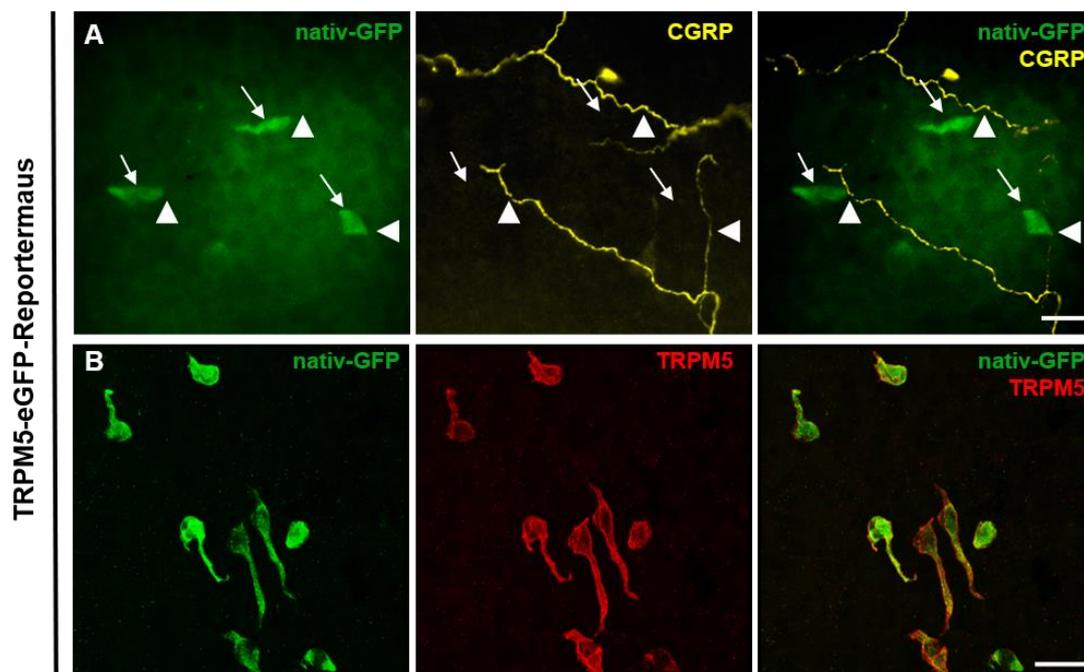


**Abbildung 36:** In SCCC der Trachea von *ChAT-eGFP* Reporter-mäusen sind eGFP, ChAT, DCLK1 und TRPM5 co-lokalisiert. (A-D): IHC an Tracheen von ChAT-eGFP-Mäusen, eGFP-Signal verstärkt mittels Antikörper. **A:** IHC an einem Gefrierschnitt. Nervenfasern sind im Bereich des Epithels mit Antikörpern gegen PGP9.5 markiert (umrandete Box). PGP9.5-positive neuroendokrine Zelle (Pfeil). Im rechten Bildausschnitt sind die cholinergen Motoneuronaxone des *Nervus recurens* immunreaktiv für PGP9.5 und eGFP (ChAT). Subepithelial gelegen sind einzelne Zellen eGFP-positiv, welche Immunzellen darstellen, vermutlich Lymphozyten (umrandete Box). Eine cholinerge chemosensorische Zelle im Epithel

ist ebenfalls eGFP-positiv (Pfeilspitze). Kernfärbung mit DAPI. **B-D**: *Whole-mount*-Präparate von ChAT-eGFP-Reportertieren. **B**: eGFP-positive Zellen sind ebenfalls markiert mit Antikörpern gegen ChAT. Pfeil weist auf teilweise sehr schwache Immunmarkierung mittels ChAT-AK (Antikörper) hin. **C**: Kolokalisation von eGFP mit TRPM5. **D**: Kolokalisation von ChAT-GFP mit DCLK1, Pfeile weisen auf Zellen hin, die nur einfach markiert sind. **A-D**: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen, Falschfarbendarstellung, Maßstabsbalken: 50  $\mu$ m. **E-G**: Quantitative Auswertung der in B-D exemplarisch dargestellten Immunmarkierungen, Mittelwert  $\pm$  SEM. **B, C, E, F**: Modifiziert aus Perniss et al. 2020b. **D, G**: Modifiziert aus Perniss et al. 2021.

### 3.2.1.2 *TRPM5*-GFP

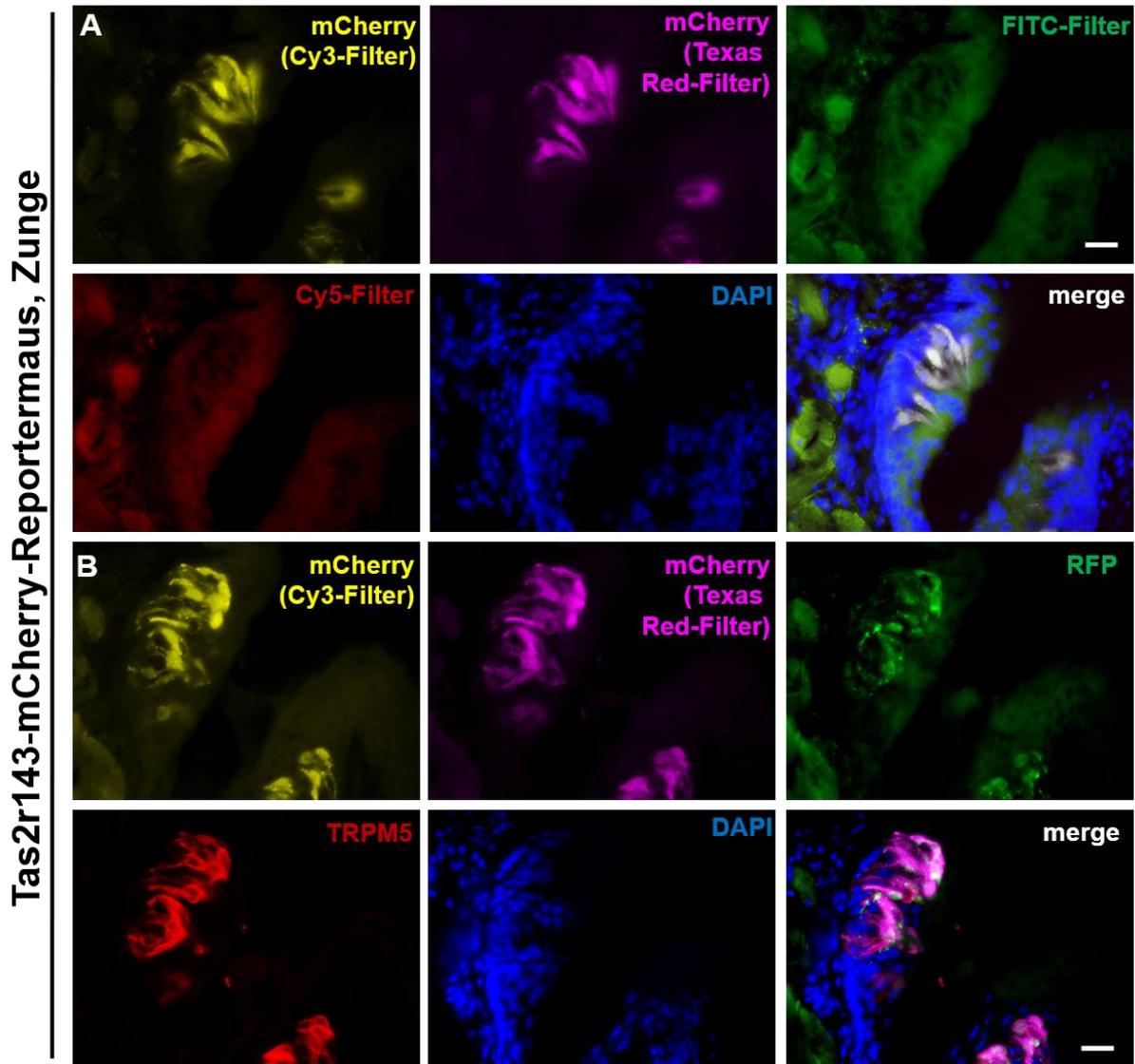
Der Mausstamm Tg(*Trpm5*-EGFP)#Sdmk (*TRPM5*-GFP) wurde von Todd R. Clapp generiert und dem Institut für Anatomie und Zellbiologie zur Verfügung gestellt (Clapp et al. 2006). Die Zucht der Tiere erfolgte anschließend in der ZVTH der JLU-Gießen. Zur Validierung des Mausstammes, welcher erstmals am Institut im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde, erfolgten immunhistochemische Färbungen. Dabei konnten einzelne eGFP-positive Zellen im Epithel gefunden werden (Abb. 37). Diese eGFP-positiven Zellen konnten ebenfalls mit Antikörpern gegen *TRPM5* markiert werden. Es konnten keine eGFP-positiven Zellen außerhalb der Epithelschicht in der Trachea gefunden werden. Aus diesem Grund eigneten sich diese Tiere für FACS-Versuche, welche im späteren Verlauf der Arbeit durchgeführt wurden.



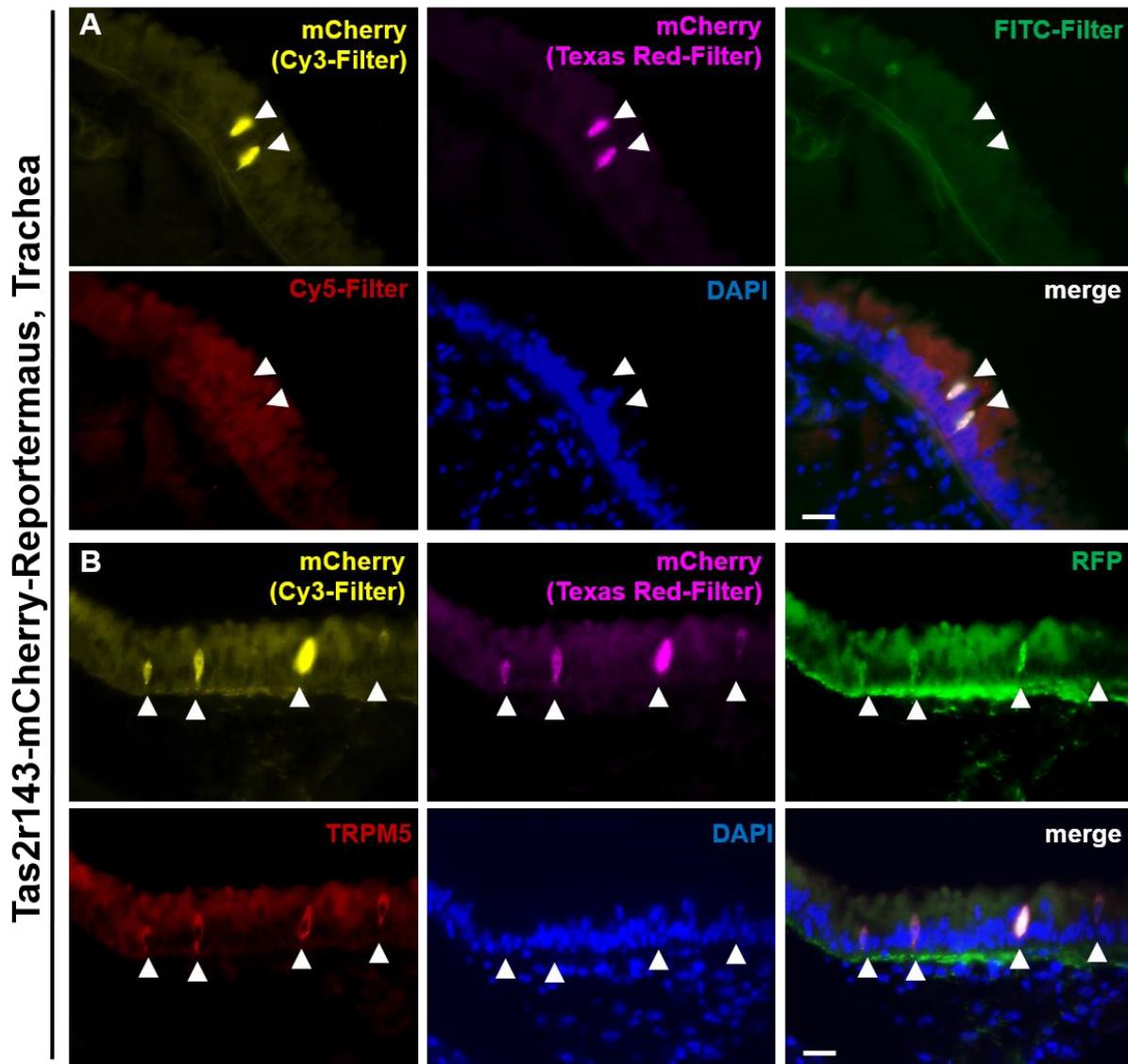
**Abbildung 37: Validierung der *TRPM5*-GFP-Reportermaus.** A-B: IHC an *Whole-Mount*-Präparaten von Tracheen von *TRPM5*-eGFP-Reporterermäusen. A: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen, GFP-positive Zellen ohne Antikörperverstärkung (Pfeile) sind nah an CGRP-positiven Nervenfasern lokalisiert (Pfeilspitzen), Falschfarbendarstellung. B: CLSM, Maximumintensitätsprojektion (10 Schnitte je 1  $\mu$ m). *TRPM5*-eGFP-positive Zellen (ohne Antikörperverstärkung) sind unter Verwendung eines Antikörpers gegen *TRPM5* ebenfalls markiert. Maßstabsbalken: A-B: 20  $\mu$ m.

#### 3.2.1.3 *Tas2r143*-mCherry

Die *Tas2r143*-mCherry-Reportermauslinie wurde von Shuya Liu (Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung, Bad Nauheim) generiert und unserer Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt. Eine Erstbeschreibung dieser Mauslinie erfolgte noch nicht. Aus diesem Grund wurde die Linie genauer charakterisiert; dabei wurde überprüft, ob eine spezifische Expression des Reporterproteins mCherry, welches unter dem Promotor des Bitterrezeptors *Tas2r143* exprimiert wird, vorliegt. Das endogene mCherry-Signal konnte unter Verwendung eines Cy3-Filters (Sperrfilter 572-647 nm) und eines Texas-Red-Filters (Sperrfilter 608-682 nm) sowohl in Zellen der Geschmacksknospen (Abb. 38) als auch in einzelnen Zellen des Trachealepithels (Abb. 39) detektiert werden. Eine Verstärkung des mCherry-Signals mit Antikörpern gegen das sequenzähnliche RFP konnte die Anzahl an sichtbaren Zellen sowohl in der Zunge als auch in der Trachea erhöhen (Abb. 38 und 39). Ein Großteil der mCherry-positiven Zellen der Zunge sowie Trachea konnte ebenfalls mit Antikörpern gegen TRPM5 markiert werden (Abb. 38 und 39). In Gefrierschnitten der Trachea waren  $87 \pm 1\%$  der TRPM5-positiven Zellen auch RFP- bzw. mCherry-positiv,  $3 \pm 1\%$  der markierten Zellen waren nur mCherry-positiv und  $10 \pm 1\%$  der Zellen nur TRPM5-positiv ( $n=3$ ; Appendix Tab. 5). Eine Expression von mCherry außerhalb des Epithels konnte in der Trachea nicht beobachtet werden.



**Abbildung 38: Charakterisierung der *Tas2r143*-mCherry-Reporterermäuse, Zunge.** IHC an Gefrierschnitten von Zungen von *Tas2r143*-mCherry-Reporterermäusen. **A-B:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen, Falschfarbendarstellung. **A:** Gefrierschnitte ohne IHC mit Antikörpern. Zellen in Geschmacksknospen zeigen eine Fluoreszenz im Cy3- sowie im Texas Red-Filter. **B:** IHC mit Antikörpern gegen RFP und TRPM5. Zellen, die im Cy3- und Texas-Red-Filter sichtbar sind, sind mit Antikörpern gegen RFP und TRPM5 markiert. Maßstabsbalken: **A-B:** 20  $\mu$ m.

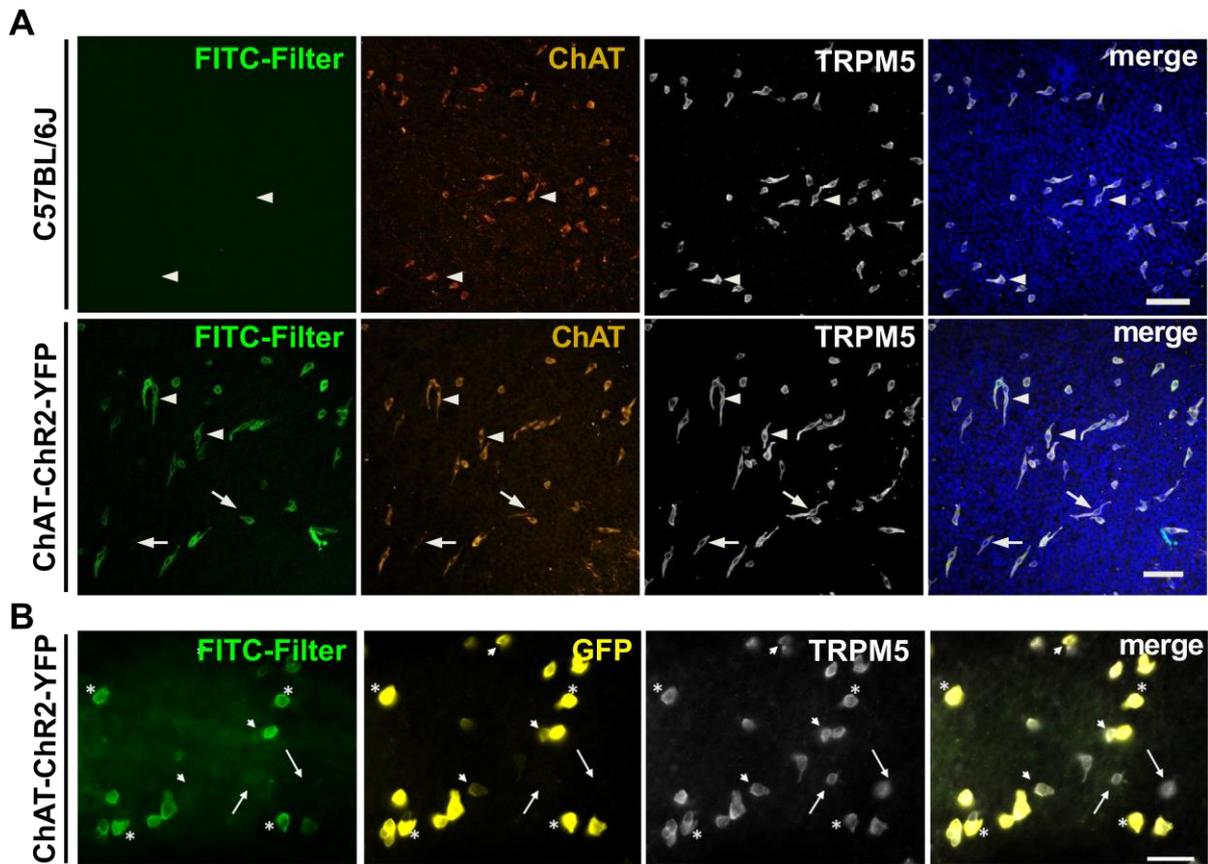


**Abbildung 39: Charakterisierung der *Tas2r143*-mCherry-Reportermause, Trachea.** IHC an Gefrierschnitten von Tracheen von *Tas2r143*-mCherry-Reportermäusen. **A-B:** fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen, Falschfarbendarstellung. **A:** Gefrierschnitte ohne IHC mit Antikörpern. Einzelne Zellen im Epithel zeigen eine Fluoreszenz im Cy3- sowie im Texas Red-Filter (Pfeilspitzen). **B:** IHC mit Antikörpern gegen RFP und TRPM5. Zellen, die im Cy3- und Texas-Red-Filter sichtbar sind, sind mit Antikörpern gegen RFP und TRPM5 markiert. Maßstabsbalken: **A-B:** 20  $\mu$ m. Kernfärbung mittels DAPI.

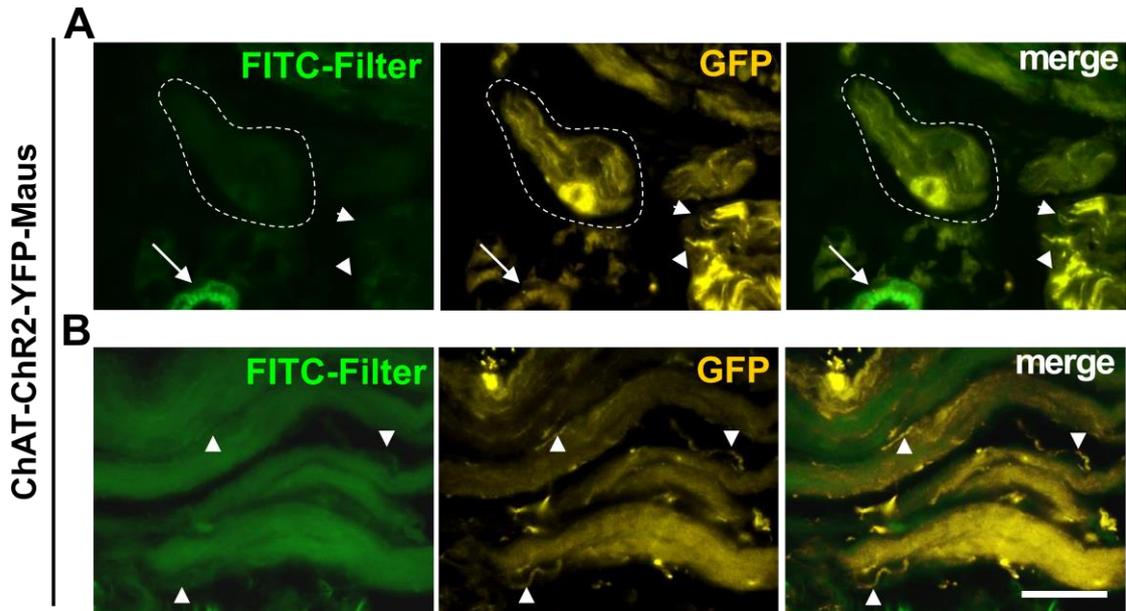
#### 3.2.1.4 *ChAT-ChR2-YFP*

In Mäusen des Stammes *ChAT-ChR2-YFP* wird unter dem Promotor der ChAT ein Fusionsprotein von Channelrhodopsin-2 (ChR2) und *Yellow fluorescent protein* (YFP) exprimiert. Dieses Fusionsprotein kann unter Verwendung eines Filters, welcher für den Farbstoff FITC geeignet ist, im Lichtmikroskop detektiert werden. Eine Verstärkung des endogenen YFP-Signals erfolgte mittels IHC unter Verwendung eines Antikörpers gegen GFP, welches eine hohe Sequenzhomologie zu YFP aufweist und daher von Antikörpern gegen GFP erkannt wird. Es zeigte sich dabei, dass einzelne Zellen im Epithel nativ ohne Antikörperverstärkung YFP-positiv waren. Die YFP-positiven Epithelzellen konnten ebenfalls mit Antikörpern gegen ChAT und TRPM5 markiert werden (Abb. 40A). Cholinerge Nervenfasern hingegen wiesen keine native Fluoreszenz in der Trachea auf. Unter Verwendung eines Antikörpers gegen GFP (YFP) wurden jedoch sowohl einzelne Epithelzellen als auch Nervenfasern und Nervenzellen in der Trachea markiert (Abb. 40B und 41).

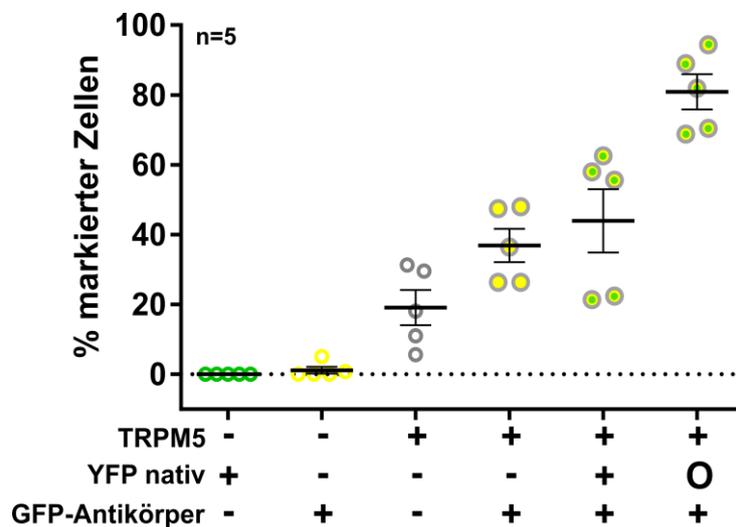
Eine Quantifizierung der Immunmarkierungen in *Whole-Mount*-Präparaten von Tracheen zeigte, dass  $44 \pm 11\%$  aller TRPM5-positiven Zellen ebenfalls nativ ohne Verstärkung YFP-positiv waren. Zusätzlich wiesen  $37 \pm 5\%$  der TRPM5-positiven Zellen eine Markierung mit Antikörpern gegen GFP (YFP) auf. Diese Zellen zeigten jedoch kein natives YFP-Signal. Addiert man die Zellen mit nativem und mittels Antikörper verstärktem YFP-Signal, entspricht dies in der Summe  $81 \pm 5\%$  aller mit TRPM5 markierten und somit aller SCCC. Zellen, die nur YFP-positiv waren, wurden nur sehr selten gefunden ( $< 1\%$  aller markierten Zellen). Die Anzahl der Zellen, die nur mit Antikörpern gegen TRPM5 markiert waren und weder eine native YFP-Expression aufwiesen noch mittels Antikörper gegen GFP markiert werden konnten, entsprach  $19 \pm 5\%$  ( $n=5$ ; Abb. 42; Appendix Tab. 6).



**Abbildung 40: Charakterisierung der *ChAT-ChR2-YFP*-Mäuse. A-B:** IHC an *Whole-Mount*-Präparaten von Tracheen von *ChAT-ChR2-YFP*- und C57BL/6J-Mäusen. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen, Falschfarbendarstellung. **A:** Obere Reihe: Trachea einer C57BL/6J Maus, keine markierten Zellen unter Verwendung eines FITC-Filters sichtbar. Einzelne Epithelzellen sind mit Antikörpern gegen TRPM5 und ChAT markiert (Pfeilköpfe). Untere Reihe: Trachea einer *ChAT-ChR2-YFP*-Maus. Einzelne Epithelzellen sind unter Verwendung eines FITC-Filters sichtbar. Diese Zellen sind ebenfalls mit Antikörpern gegen ChAT und TRPM5 markiert (Pfeilköpfe). Pfeile markieren Zellen, die TRPM5- und/oder ChAT-positiv, aber nicht YFP-positiv sind. Kernfärbung mittels DAPI. Maßstabsbalken: 50  $\mu$ m. **B:** Trachea einer *ChAT-ChR2-YFP*-Maus. Epithelzellen sind unter Verwendung eines FITC-Filters sichtbar. Einzelne Zellen sind nicht sichtbar, aber unter Verwendung eines Antikörpers gegen GFP markiert (kurze Pfeile). Einzelne Zellen sind nur TRPM5-positiv (lange Pfeile). Einzelne Zellen sind nativ in FITC markiert, GFP-positiv sowie TRPM5-positiv (Sternchen). Maßstabsbalken: 20  $\mu$ m. Modifiziert aus Perniss et al. 2020b.



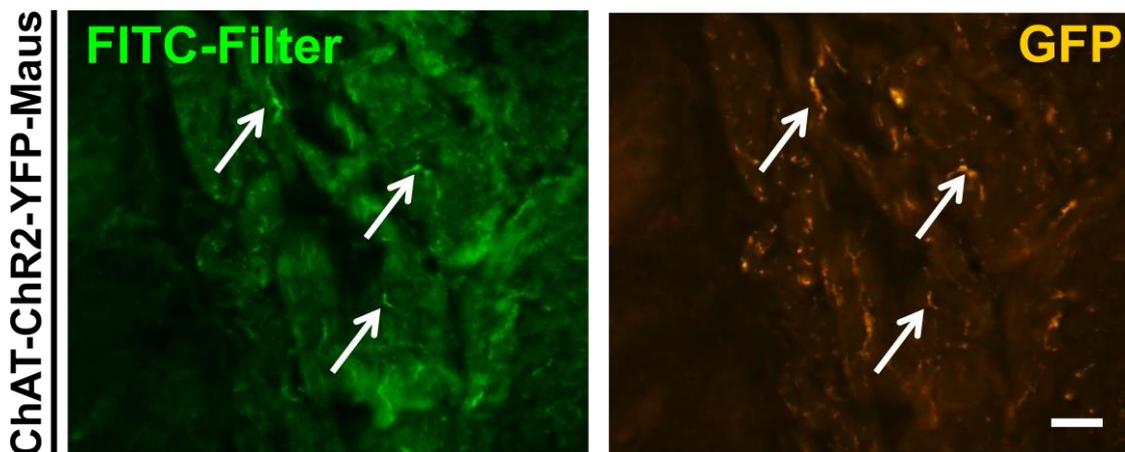
**Abbildung 41: Charakterisierung der *ChAT-ChR2-YFP*-Mäuse – Neurone.** A-B: IHC an Gefrierschnitten von Tracheen von *ChAT-ChR2-YFP*-Mäusen, Falschfarbendarstellung. **A:** Ein Ganglion (gestrichelte Linie) und Nervenfaserbündel (Pfeilköpfe) sind unter Verwendung eines FITC-Filters nicht sichtbar, aber markiert mit Antikörpern gegen GFP (YFP), Pfeile markieren das Endothel eines Gefäßes, welches eine Autofluoreszenz im FITC-Filter aufweist. **B:** Nervenfasern im *Musculus trachealis* (Pfeilköpfe) sind unter Verwendung eines FITC-Filters nicht sichtbar, aber markiert mit Antikörpern gegen GFP. **A-B:** Maßstabsbalken: 20 µm. Modifiziert aus Perniss et al. 2020b.



**Abbildung 42: Quantitative Auswertung der IHC an Tracheen von *ChAT-ChR2-YFP*-Mäusen.** In *Whole-Mount*-Präparaten von *ChAT-ChR2-YFP*-Mäusen konnten keine Zellen beobachtet werden, welche nur YFP-positiv sind, aber nicht mit Antikörpern gegen TRPM5 markiert sind (grüne Kreise). Weniger als 1 % aller markierten Zellen zeigen eine Markierung mit Antikörpern gegen GFP (YFP) und sind nicht TRPM5-positiv (gelbe Kreise). Circa 19 % aller markierten Zellen sind nur TRPM5-positiv (graue Kreise). Circa 37 % der markierten Zellen weisen keine native Markierung in YFP auf, sind aber TRPM5-positiv (graue Kreise; gelbe Füllung). Circa 44 % aller markierten Zellen weisen eine native YFP-Markierung auf und sind TRPM5-positiv (graue Kreise; gelbe und grüne Füllung). Circa 81 % aller markierten

Zellen können mit Hilfe eines Antikörpers gegen GFP (YFP) markiert werden und sind TRPM5-positiv (rechte Spalte, Symbol= O), Mittelwert  $\pm$  SEM. Modifiziert aus Perniss et al. 2020b.

In der Harnblase der Maus hingegen wiesen Nervenfasern im *Musculus detrusor vesicae* eine native Expression von ChR2-YFP auf, welche unter Verwendung eines FITC-Filters sichtbar war. Diese Nervenfasern konnten ebenfalls unter Verwendung eines Antikörpers gegen GFP markiert werden (Abb. 43).



**Abbildung 43: IHC einer Harnblase einer *ChAT-ChR2-YFP*-Maus.** Einzelne Nervenfasern im *Musculus detrusor vesicae* weisen eine YFP-Expression auf, welche unter Verwendung eines FITC-Filters sichtbar ist. Diese kann ebenfalls unter Verwendung von Antikörpern gegen GFP (YFP) beobachtet werden. Maßstabsbalken: 20  $\mu$ m. Modifiziert aus Perniss et al. 2020b.

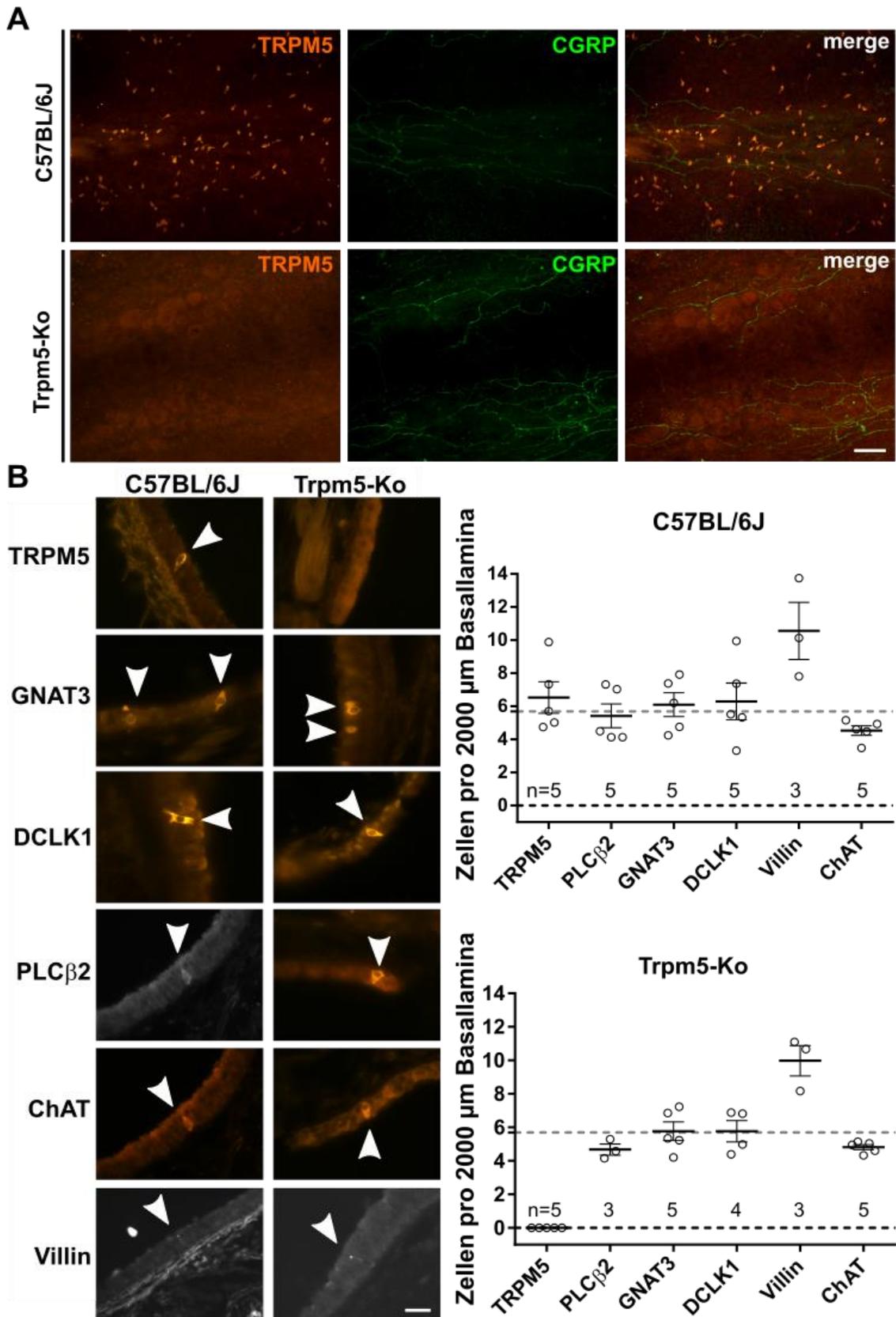
### 3.2.2 Gendefiziente Mausstämmе

Im Verlauf dieser Arbeit wurden verschiedene gendefiziente Mausstämmе verwendet, siehe Tabelle 17. Diese wurden entweder in der ZVTH der JLU Gießen gezüchtet und/oder gehalten, oder Versuche wurden an unterschiedlichen Universitäten und Instituten, in denen die Tiere gezüchtet wurden, durchgeführt (Tab. 17, Abschnitt 2.1.9) oder Organe der Tiere entnommen und am Institut für Anatomie und Zellbiologie analysiert. Die gendefizienten Mausstämmе *Trpm5*-Ko und *Pou2f3*-Ko wurden in der Zentralen Versuchstierhaltung gezüchtet und werden im nachfolgendem charakterisiert. Exemplarisch wurden zudem der Mausstamm *M3R*-Ko, welcher von Jackson Laboratory bezogen wurde, und der Mausstamm *Tas2R*-Ko, welcher von dem MPI für Herz- und Lungenforschung, Bad Nauheim, zur Verfügung gestellt wurde, charakterisiert.

#### 3.2.2.1 *Trpm5*-Ko

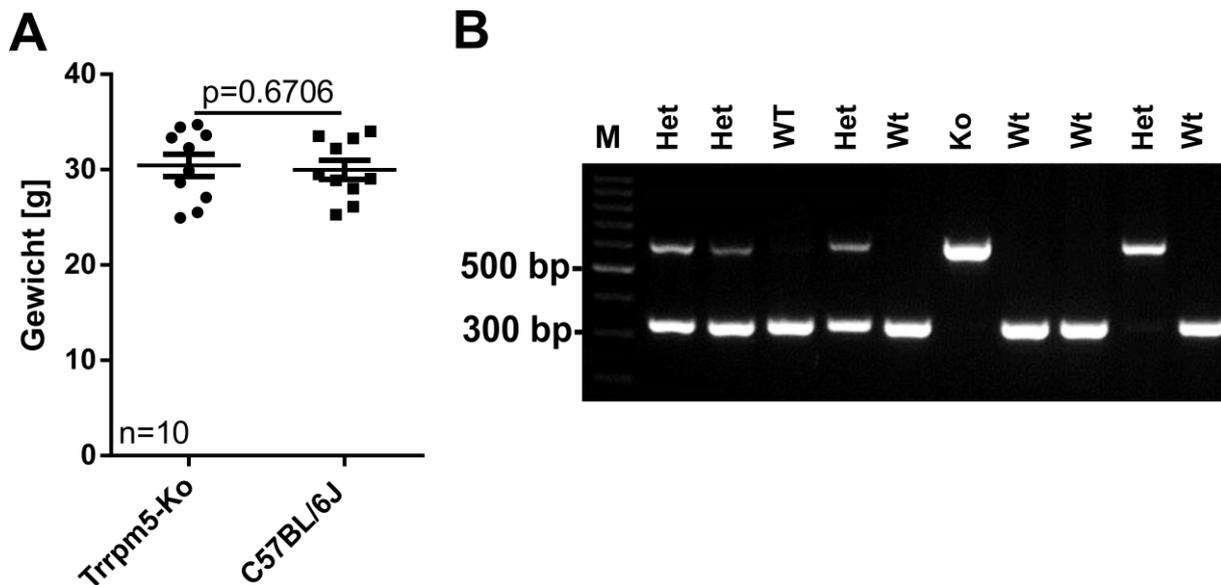
Bei der Mauslinie *Trpm5*-Ko (B6.129P2-*Trpm5*<sup>tm1Dgen</sup>/J) wurde der Promotor des *Trpm5*-Gens genutzt und an Stelle der TRPM5 kodierenden DNA wird in dieser Mauslinie lacZ ( $\beta$ -Galactosidase) exprimiert (Deltagen, Inc., San Carlos, U.S.A.). Diese Mäuse besitzen daher keinen funktionellen TRPM5-Ionenkanal. Wie in Abb. 44A dargestellt, war eine Immunmarkierung mit Antikörpern gegen TRPM5 in diesen Tieren nicht möglich. Dagegen war die Expression anderer Proteine der Geschmackstransduktionskaskade (GNAT3, PLC $\beta$ 2) und weiterer SCCC-Marker (DCLK1, ChAT, Villin (Advillin)) nicht beeinträchtigt (Abb. 44B; Appendix Tab. 7).

Da TRPM5 ein Protein der Geschmackstransduktionskaskade darstellt und eine Deletion dieses Proteins mit einer Beeinträchtigung der Geschmackswahrnehmung in Mäusen einhergeht (Dutta Banik et al. 2018), wurde zudem untersucht, ob im Vergleich zu C57BL/6J-Mäusen ein Unterschied im Körpergewicht von adulten weiblichen Mäusen besteht; dies war jedoch nicht der Fall ( $p=0,6706$ ;  $n=10$ , Abb. 45A, Mann-Whitney-U-Test). Tiere der Linie *Trpm5*-Ko wurden heterozygot gezüchtet (Abb. 45B). Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass sich diese Mauslinie eignet, um die Funktion des Ionenkanals TRPM5 in SCCC zu untersuchen.



**Abbildung 44: Charakterisierung der *Trpm5*-Ko-Mäuse, Teil 1. A:** IHC an *Whole-Mount*-Präparaten von Tracheen einer C57BL/6J-Maus (obere Reihe) und einer *Trpm5*-Ko-Maus (untere Reihe), Aufnahmen mit einer Farbkamera, Darstellung der Originalfarben. Einzelne Epithelzellen der C57BL/6J-Trachea sind mit Antikörpern gegen TRPM5 markiert. Diese

Markierung ist in der Trachea der *Trpm5*-Ko-Maus nicht vorhanden. Nervenfasern und neuroendokrine Zellen sind in beiden Mausstämmen mit Antikörpern gegen CGRP markiert. **B:** IHC an Gefrierschnitten von Tracheen von C57BL/6J und *Trpm5*-Ko-Mäusen, Aufnahmen mit einer Farbkamera (außer Villin: Schwarz Weiß-Kamera), Darstellung der Originalfarben (außer Villin). Einzelne Epithelzellen sind mit Antikörpern gegen SCC-Marker markiert. In *Trpm5*-Ko Tieren fehlt hingegen die Markierung mit Antikörpern gegen TRPM5. Die Anzahl der mit anderen Antikörpern markierten Zellen ist jedoch unverändert. Die grau gestrichelte Linie stellt die durchschnittliche Anzahl an markierten Zellen in C57BL/6J- und *Trpm5*-Ko-Mäusen dar. **B:** Modifiziert aus Perniss et al. 2020b. Maßstabsbalken: **A:** 50  $\mu$ m; **B:** 20  $\mu$ m, Mittelwert  $\pm$  SEM.

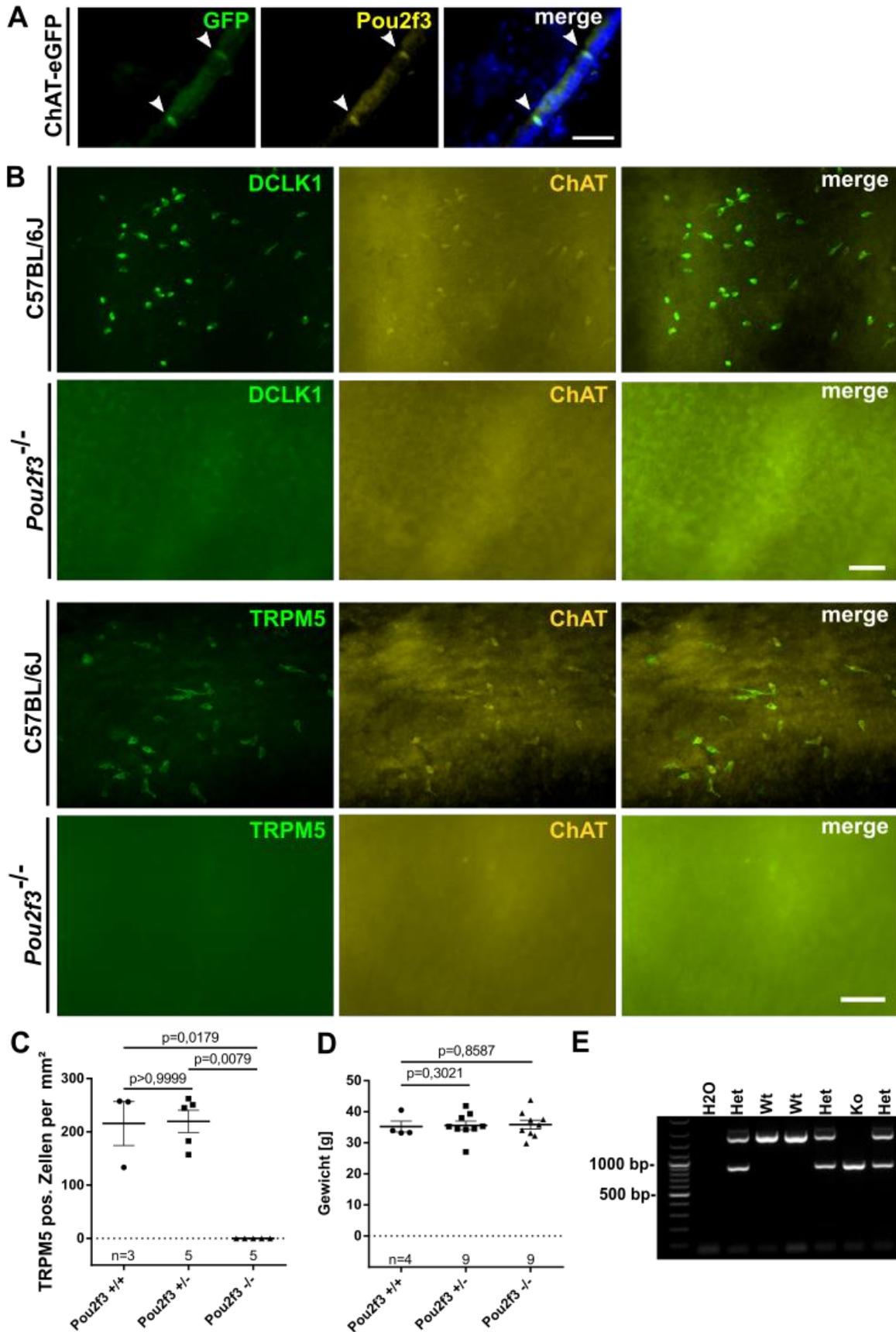


**Abbildung 45: Charakterisierung der *Trpm5*-Ko Mäuse, Teil 2. A:** Körpergewichte von adulten weiblichen *Trpm5*-Ko und C57BL/6J-Mäusen unterscheiden sich nicht voneinander (Mann-Whitney-U-Test), Mittelwert  $\pm$  SEM. **B:** Genotypisierung von Ohrstanzproben eines Wurfes von heterozygoten Elterntieren der Linie *Trpm5*-Ko. Das PCR-Produkt für Tiere ohne verändertes *Trpm5*-Gen weist eine Größe von 331 bp auf (Wt), das von Ko-Tieren eine Größe von 590 bp, heterozygote Tiere (Het) weisen beide PCR-Produkte auf. M = Marker 100 bp.

### 3.2.2.2 *Pou2f3*-Ko

Der Mausstamm *Pou2f3*-Ko (*Pou2f3*<sup>tm1Abek</sup>) wurde von Ichiro Matsumoto (Monell, Chemical Senses Center, Philadelphia, USA) zur Verfügung gestellt. In diesem Mausstamm ist der Transkriptionsfaktor *Pou2f3* (*Skn-1a*) deletiert. Dies führt in diesen Tieren zu einem Verlust der Wahrnehmung der Geschmacksqualitäten bitter, süß und umami. Die Morphologie der Geschmackszellen der Zunge hingegen blieb unverändert (Matsumoto et al. 2011). Ein weiteres Merkmal dieses Mausstammes ist das Fehlen von SCC im Epithel von verschiedenen Organen, z.B. Trachea, Magen, Dünndarm, Dickdarm, Urethra, Thymus, Pankreasgang und der *Tuba auditiva* (Yamashita et al. 2017). Im Rahmen dieser Arbeit wurde zum ersten Mal der Mausstamm in unserer Arbeitsgruppe verwendet. Aus diesem Grund erfolgte eine

Charakterisierung des Mausstammes. Immunhistochemische Markierungen zeigten, dass ChAT-eGFP-positive Zellen im Epithel der Trachea auch mit Antikörpern gegen Pou2f3 markiert waren (Abb. 46A). Immunhistochemische Markierungen an trachealen *Whole-Mount*-Präparaten zeigten, dass im Gegensatz zu Tracheen von C57BL/6J-Tieren in *Pou2f3*-Ko-Tieren keine Markierung mit Antikörpern gegen TRPM5, ChAT und DCLK1 zu beobachten war (Abb. 46B). Die Anzahl an TRPM5-positiven Epithelzellen unterschied sich zwischen heterozygoten und homozygoten Wildtyp-Tieren nicht (Abb. 46C; Appendix Tab. 8;  $p > 0,9999$ ;  $n=5$ , Mann-Whitney-U-Test). Ein Unterschied im Körpergewicht zwischen homozygoten Wildtyp-Tieren, heterozygoten Tieren oder homozygoten Knock-out-Tieren konnte ebenfalls nicht beobachtet werden (Abb. 46D; Appendix Tab. 9;  $p=0,3021$ ;  $p=0,8587$ ;  $n=4-9$ , Mann-Whitney-U-Test). Die Versuchstiere wurden aus Verpaarungen von heterozygoten Elterntieren gewonnen. Dabei wiesen im Rahmen der Genotypisierung Wildtyp-Tiere ein PCR-Produkt von 1600 bp, Knock-out-Tiere ein PCR-Produkt mit 800 bp und heterozygote Tiere beide PCR-Produkte auf (Abb. 46E). Es kann daraus geschlossen werden, dass die Mauslinie *Pou2f3*-Ko in der Trachea keine SCC besitzt und sich zur Untersuchung von SCCC-bedingten Mechanismen eignet. Heterozygote oder homozygote Wildtyp-Tiere können als Kontrolltiere verwendet werden, da kein Unterschied in der Zellzahl der SCCC zwischen den beiden Genotypen festgestellt werden konnte.

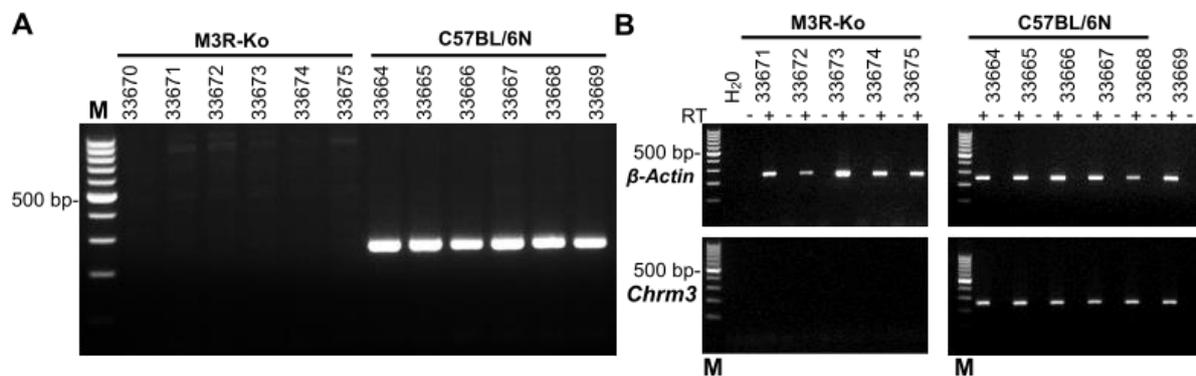


**Abbildung 46: Charakterisierung der *Pou2f3*-Ko-Mäuse.** **A:** IHC an Gefrierschnitten einer ChAT-eGFP-Trachea. eGFP-positive Zellen waren ebenfalls mit Antikörpern gegen *Pou2f3*

markiert. Modifiziert aus Perniss et al. 2020b. **B**: Epithelzellen in C57BL/6J-Mäusen sind mit Antikörpern gegen DCLK1, ChAT und TRPM5 markiert (Pfeilspitzen). Diese Markierung war in *Pou2f3*-Ko-Mäusen nicht vorhanden. Maßstabsbalken: **A**: 20  $\mu\text{m}$ ; **B**: 50  $\mu\text{m}$ . **C**: Quantitative Auswertung von IHC-Färbungen. Homozygote Wildtyptiere und heterozygote Tiere wiesen die gleiche Anzahl an TRPM5-positiven Zellen auf. Homozygote Ko-Tiere wiesen keine TRPM5-Markierung auf. **D**: Das Körpergewicht unterschied sich zwischen den drei untersuchten Genotypen nicht. **C-D**: Mann-Whitney-U-Test, Mittelwert  $\pm$  SEM. **E**: Genotypisierung von Ohrstanzproben eines Wurfes von heterozygoten Elterntieren der Linie *Pou2f3*-Ko. Das PCR-Produkt für Tiere ohne verändertes *Pou2f3*-Gen wies eine Größe von 1600 bp auf, das von Ko-Tieren eine Größe von 800 bp; heterozygote Tiere wiesen beide PCR-Produkte auf. M = Marker 100 bp bzw. 200 bp ab 1000 bp.

3.2.2.3 *M3R*-Ko

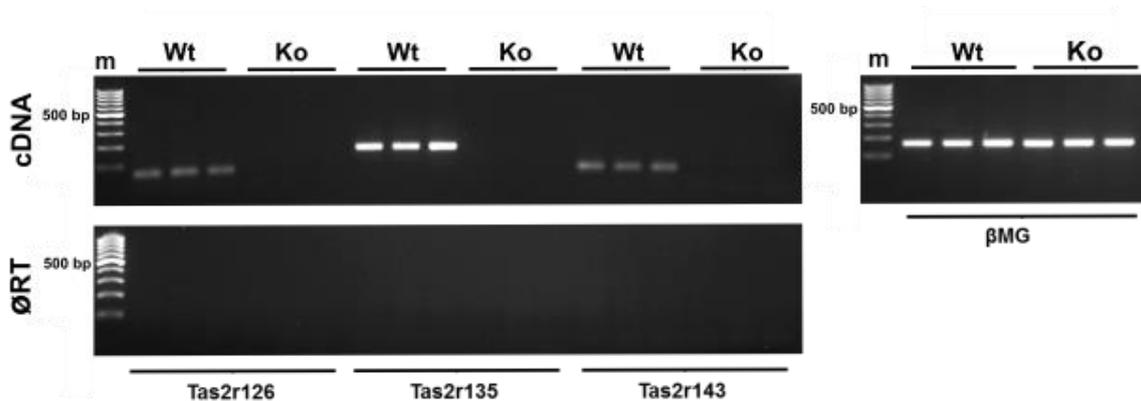
Die Mauslinie *M3R*-Ko (6N.129S6(B6J)-*Chrm3*<sup>tm1Jwe/J</sup>) wurde von Jackson Laboratory bezogen. In diese Mauslinie ist der muskarinische Acetylcholinrezeptor M3 deletiert. Dieser Rezeptor ist in verschiedenen Organen exprimiert, z.B. Gehirn, exokrine Drüsen, Herz, Harnblase, Lunge und Trachea (zusammengefasst von Caulfield 1993; Stengel et al. 2002). Zudem wird dieser Rezeptor von zilienträgenden Zellen der Atemwege exprimiert und ist dort für die Regulation der Zilienbewegung durch ACh essentiell (Klein et al. 2009). Die Mauslinie *M3R*-Ko wurde nicht am Institut für Anatomie und Zellbiologie gezüchtet, sondern die Tiere wurden direkt für Versuche bei Jackson geordert und nach einer Akklimationszeit von einer Woche verwendet. Den Ko-Tieren sowie den korrespondierenden Wt-Tieren wurden nach der Tötung die Schwanzspitze und ein Teil der Lunge entnommen und auf DNA- und RNA-Ebene untersucht, ob ein intaktes *Chrm3*-Gen bzw. -mRNA vorlag. Dabei zeigte sich nach DNA-Isolation aus den Schwanzspitzenproben und anschließender PCR, dass alle Kontrolltiere (C57BL/6N) unter Verwendung spezifischer *Primer* für ein unverändertes *Chrm3*-Gen eine Bande aufwiesen. Im Gegensatz dazu konnte in *M3R*-Ko-Tieren kein PCR-Produkt detektiert werden (Abb. 47A). Aus den Lungenproben wurde mRNA isoliert; eine anschließende RT-PCR zeigte das Vorhandensein von *Chrm3*-mRNA in den Kontrolltieren. In den Ko-Tieren war dies nicht der Fall (Abb. 47B).



**Abbildung 47: Charakterisierung der *M3R*-Ko-Mäuse.** **A:** PCR mit *Primern* für den M3R nach DNA-Extraktion aus Schwanzbiopsien, Tieridentifikationsnummern oberhalb der Gel-Bilder. C57BL/6N wiesen ein PCR-Produkt (245 bp) auf. **B:** RT-PCR von Lungen mit *Primern* für  $\beta$ -Aktin (249 bp; obere Reihe) und *Chrm3* (245 bp; untere Reihe). Transkripte von  $\beta$ -Aktin waren in allen Proben zu finden. Hingegen waren Transkripte von M3R nur in den C57BL/6N vorhanden. RT- = ohne reverse Transkriptase, RT+ = mit reverser Transkriptase. M = Marker 100 bp.

3.2.2.4 *Tas2r-Ko*

Die Mauslinie *Tas2r-Ko* (B6.(*Tas2r143-Tas2r135-Tas2r126*)<sup><tm></sup>) wurde von Shuya Liu (MPI Bad Nauheim) generiert, der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt und erstmals für Experimente verwendet. Der Mausstamm wurde so konstruiert, dass eine Deletion des Gen-Clusters für die Bitterrezeptoren *Tas2r143*, *Tas2r135* und *Tas2r126*, vorliegt. Diese Rezeptoren sind in den Geschmackszellen der Zunge sowie *Tas2r135* und *Tas2r126* in trachealen SCCC exprimiert (Liu et al. 2017). Um die Deletion des Gen-Clusters zu verifizieren, wurde mRNA aus der Zunge isoliert und eine RT-PCR mittels spezifischer *Primer* für die drei Bitterrezeptoren von Petra Hartmann (Institut für Anatomie und Zellbiologie) durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass Transkripte dieser nur in den Wildtypen, jedoch nicht in den *Ko*-Tieren vorhanden waren (Abb. 48).

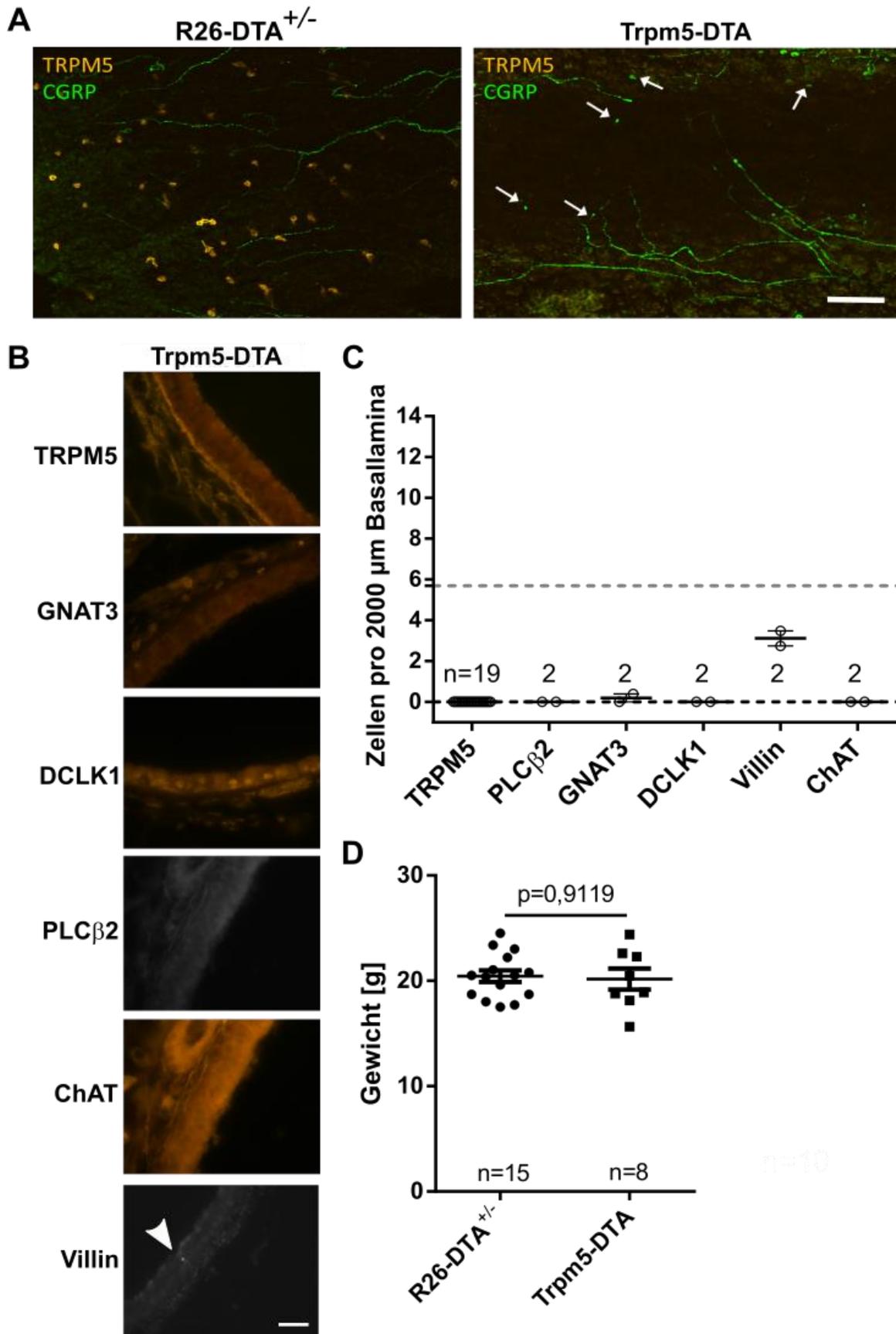


**Abbildung 48: Charakterisierung der *Tas2r-Ko*-Mauslinie.** RT-PCR von Zungen von *Tas2r-Ko*-Tieren und C57BL/6J (Wt)-Mäusen. Linkes Panel: Transkripte der Bitterrezeptoren *Tas2r126* (62 bp), *Tas2r135* (160 bp) und *Tas2r143* (69 bp) waren nur in den Wt-Tieren zu sehen. Rechtes Panel: RT-PCR mit *Primer* für  $\beta$ 2-Mikroglobulin (192 bp), dient als Kontrolle zur Überprüfung einer erfolgreichen cDNA-Synthese.  $\emptyset$ RT = ohne reverse Transkriptase. = Marker 100 bp. Modifiziert aus Perniss et al. 2020b.

### 3.2.3 Zellablationsmodell *Trpm5*-DTA

Um die Mauslinie *Trpm5*-DTA (*Trpm5*-IRES-Cre-R26:lacZbpA<sup>flox</sup>DTA) zu generieren, wurden die Mauslinien *Trpm5*-IRES-Cre und R26:lacZbpA<sup>flox</sup>DTA miteinander verpaart. Die Mauslinie R26:lacZbpA<sup>flox</sup>DTA ist dabei Träger des konditionellen Toxinallels (DTA). Die andere Mauslinie, *Trpm5*-IRES-Cre, dient als „Aktivatorstamm“ (Promotor-Cre (*Trpm5*)). Werden diese beiden Stämme miteinander verpaart, erfolgt nach erfolgreicher Rekombination die Expression des Diphtherietoxins in Zellen, in denen der *Trpm5*-Promotor aktiv ist. In Folge dessen sterben diese Zellen ab. Eine Steuerung für den Zeitpunkt der Ablation der TRPM5-positiven Zellen ist in diesem Modell nicht möglich. Als Kontrolltiere dienten Tiere, in denen keine Cre-Recombinase exprimiert wird (*Trpm5*-IRES-CRE (Wt) verpaart mit R26:lacZbpA<sup>flox</sup>DTA). Die Mauslinien wurden von Ulrich Boehm (Experimentelle Pharmakologie, Universität des Saarlandes) zur Verfügung gestellt. Die Haltung und Zucht erfolgten unter Kontrolle von Gabriela Krasteva-Christ (Institut für Anatomie, Zellbiologie und Entwicklungsbiologie, Universität des Saarlandes). Der Mausstamm wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals in der Arbeitsgruppe verwendet und wird im Folgenden genauer charakterisiert.

Immunmarkierungen an trachealen *Whole-mount*-Präparaten zeigten TRPM5-positiv Epithelzellen in Kontrolltieren (R26-DTA<sup>+/-</sup>), jedoch nicht in Tracheen von *Trpm5*-DTA-Tieren (Abb. 49A). In trachealen Gefrier- und Paraffinschnitten von *Trpm5*-DTA-Tieren konnten ebenfalls keine TRPM5-positiven Zellen gefunden werden. Zusätzlich wurden auch keine GNAT3-, DCLK1-, PLC $\beta$ 2- und ChAT-positiven Zellen gefunden. Im Gegensatz dazu wurde eine geringe Anzahl an Villin-positiven Zellen beobachtet. Diese ist im Vergleich zu C57BL/6J-Tieren tendenziell geringer (Abb. 49B und C; Appendix Tab. 7). Es bestand kein Unterschied im Körpergewicht von *Trpm5*-DTA-Tieren und korrespondierenden Wt (Abb. 49D; Appendix Tab. 10;  $p=0,9119$ ;  $n=8-15$ ; Mann-Whitney-U-Test). Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass SCCC in diesem Mausmodell in Tracheen von adulten Mäusen nicht vorhanden sind.



**Abbildung 49: Charakterisierung der TRPM5-DTA-Mäuse. A:** IHC an *Whole-mount*-Präparaten (CLSM). TRPM5-positive Zellen sind nur in Kontrolltieren (R26-DTA<sup>+/-</sup>) erkennbar.

Nervenfasern und neuroendokrine Zellen (Pfeile) sind mit Antikörpern gegen CGRP in beiden Mausstämmen markiert. **B**: IHC an Gefrier- und Paraffinschnitten von Trpm5-DTA Tieren, Farbkameraaufnahmen, Darstellung der Originalfarben (außer Villin, Schwarz-Weiß-Kamera). Nur mit Antikörpern gegen Villin können Zellen im Epithel markiert werden (Pfeilkopf). Maßstabsbalken: **A**: 50  $\mu\text{m}$ ; **B**: 20  $\mu\text{m}$ . **C**: Auswertung der IHC, welche in B exemplarisch abgebildet ist. Die Grau Gestrichelte Linie deutet den Mittelwert an markierten Zellen in C57BL/6J-Mäusen an. **D**: Das Körpergewicht von adulten (3-5 Monate) weiblichen Trpm5-DTA-Tieren unterscheidet sich nicht von korrespondierenden Wt (Mann-Whitney-U-Test). **A-C**: Modifiziert aus Perniss et al. 2020b. **C-D**: Mittelwert  $\pm$  SEM.

### 3.3 Entwicklung der SCCC in der Trachea der Maus

Es wurde untersucht, ob SCCC in der Trachea bereits vor der Geburt vorhanden sind, in welchem Maße sich die Anzahl in Abhängigkeit vom Alter der Tiere verändert und ob ein Zusammenhang zwischen der Mikrobiota der Maus und der Anzahl an SCCC besteht. Hierzu wurden verschiedene Mausstämme verwendet und die Anzahl der SCCC mittels immunhistochemischer Markierungen ermittelt.

#### 3.3.1 Anzahl der SCCC in Tracheen von ChAT-eGFP-Mäusen in Abhängigkeit vom

##### Alter der Versuchstiere

Sowohl in männlichen als auch in weiblichen neugeborenen Tieren des Stammes B6.Cg-Tg(RP23-268L19-EGFP)2Mik/J (*ChaT*-eGFP) konnten bereits am Tag der Geburt (P0) eGFP-positive Zellen im Epithel der Trachea beobachtet werden (Abb. 50A). Um festzustellen, ob sich SCCC schon vor der Geburt in der Trachea entwickeln, wurden Embryonen eines weiteren ChAT-eGFP-Reporterstammes untersucht (Engelhardt et al. 2007). Dabei wurden folgende Entwicklungsstadien beurteilt: E12 (4 Embryonen), E14 (5 Embryonen), E16 (8 Embryonen), E18 (6 Embryonen). Im Gegensatz zu postnatalen Tieren, bei denen *Whole-mount*-Präparate untersucht wurden, wurden bei Embryonen Sagittalschnitte hergestellt und beurteilt (Abb. 51A). Als Positivkontrolle diente das Rückenmark der Embryonen, in dem cholinerge Motoneurone ChAT- bzw. eGFP-positiv waren (Abb. 51B). Nur in Embryonen kurz vor der Geburt (E18) konnten sowohl TRPM5- als auch eGFP-positive Zellen im Trachealepithel nachgewiesen werden (Abb. 51C). Die Anzahl der beobachteten eGFP-positiven Zellen war jedoch sehr gering, so konnte in den Sagittalschnitten eines Embryos nur eine Zelle gefunden werden, in zwei weiteren Embryonen konnten je zwei Zellen beobachtet werden, in einem weiteren Embryo vier Zellen und sechs Zellen in einem weiteren Embryo. In einem Embryo wurden keine eGFP-positiven Zellen gefunden. Die Jungtiere unmittelbar nach der Geburt (P0) wiesen eine nicht signifikant unterschiedliche Anzahl an ChAT-eGFP positiven Zellen auf wie die Jungtiere des Stammes B6.Cg-Tg(RP23-268L19-EGFP)2Mik/J ( $54 \pm 12$  vs.  $38 \pm 1$  eGFP-positive Zellen;  $p=0,2424$ ;  $n=3-8$ ; Mann-Whitney-U-Test; Appendix Tab. 11). Da die Anzahl der Zellen auch im Zusammenhang mit der Gesamtfläche des Epithels steht, wurde

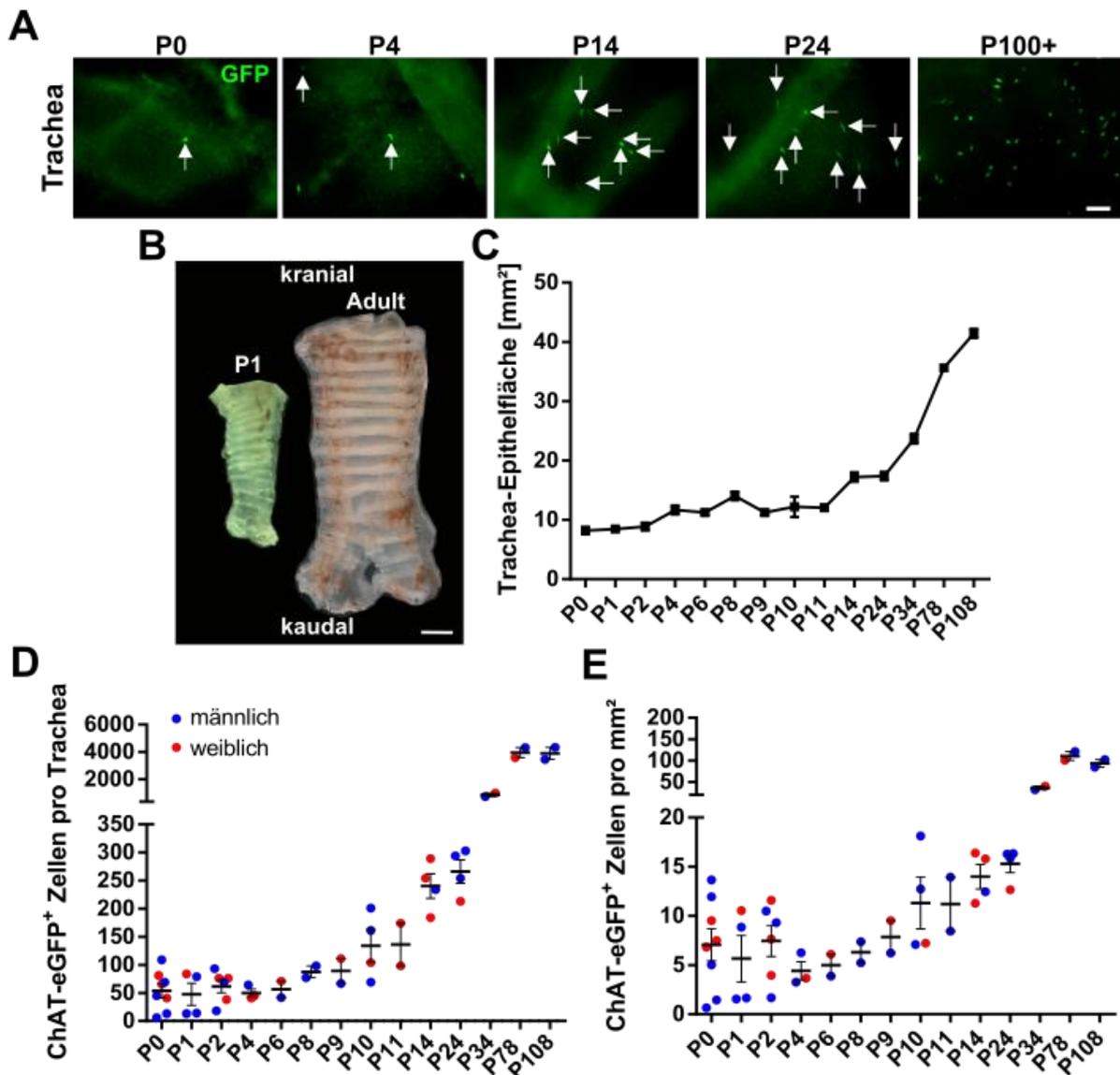
ebenfalls die Anzahl der Zellen pro Fläche ( $\text{mm}^2$ ) bestimmt. Die Gesamtfläche der Trachea betrug am Tag der Geburt  $8 \pm 0,6 \text{ mm}^2$  ( $n=8$ ) und nahm bis auf  $39 \pm 2 \text{ mm}^2$  ( $n=4$ ) im adulten Tier zu (Abb. 50B und C). Die durchschnittliche Anzahl der Zellen am Tag P0 betrug  $54 \pm 12$ , dies entspricht  $7 \pm 2$  Zellen pro  $\text{mm}^2$  ( $n=8$ ). Die Anzahl der Zellen steigerte sich bis zum Tag P6 (6 Tage nach Geburt) nur unwesentlich auf  $57 \pm 15$  Zellen, ohne dass die Zelldichte zunahm ( $5 \pm 1$  Zellen pro  $\text{mm}^2$ ; ( $n=2$ )). Im weiteren Verlauf nahm jedoch die Anzahl an SCCC rasant zu. So konnten in 8 Tage alten Tieren  $88 \pm 11$  Zellen ( $6 \pm 1$  Zellen pro  $\text{mm}^2$ ; ( $n=2$ )) und in 14 Tage alten Tieren bereits  $240 \pm 22$  Zellen ( $14 \pm 1$  Zellen pro  $\text{mm}^2$  ( $n=4$ )) beobachtet werden. Bereits nach 34 Tagen, kurz nach dem gewöhnlichen Zeitpunkt des Absetzens der Jungtiere (21-28 Tage nach der Geburt), lag die Anzahl der Zellen bei  $854 \pm 125$  ( $35 \pm 4$  Zellen pro  $\text{mm}^2$ ; ( $n=2$ )). In adulten Tieren (P78-108) konnten  $3922 \pm 234$  Zellen ( $39 \pm 8$  Zellen pro  $\text{mm}^2$ ; ( $n=4$ )) gefunden werden (Abb. 50D und E; Appendix Tab. 11). Ein geschlechtsspezifischer Unterschied in der Anzahl der SCCC konnte nicht beobachtet werden. So lag diese in weiblichen Tieren im Alter von P0-P8 bei  $64 \pm 6$  ( $n=9$ ), die Anzahl der Zellen in männlichen Tieren im gleichen Alter bei  $63 \pm 10$  ( $n=19$ ), ( $p=0,7999$ ; Mann-Whitney-U-Test). In adulten Tieren (P34-P108) konnte ebenfalls kein Unterschied in der Anzahl an SCCC zwischen männlichen ( $3209 \pm 852$  Zellen;  $n=4$ ) und weiblichen Tieren beobachtet werden ( $2280 \pm 1301$  Zellen;  $n=2$ ;  $p=0,5333$ ; Mann-Whitney-U-Test) beobachtet werden (Abb. 50D und E).

#### 3.3.1.1 Co-Expression von ChAT-eGFP und TRPM5 in Abhängigkeit vom Alter der Versuchstiere

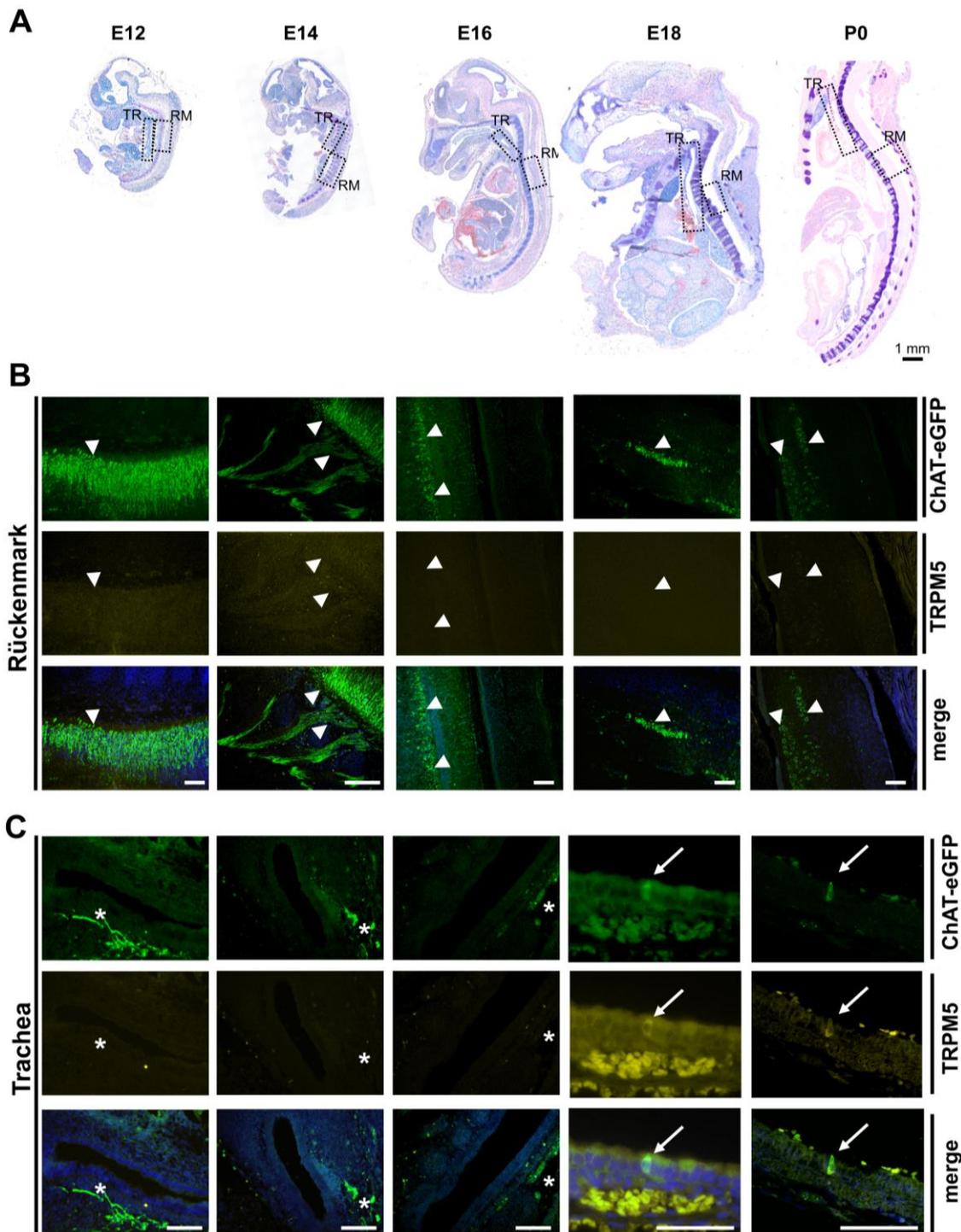
Wie in Abschnitt 3.2.1.1 dargestellt, wiesen in adulten Tieren  $86 \pm 10\%$  ( $n=3$ ) der ChAT-eGFP-positiven Epithelzellen ebenfalls eine Markierung mit Antikörpern gegen TRPM5 auf. Die Anzahl der nur TRPM5-positiven Zellen dagegen betrug nur  $2 \pm 0,5\%$  ( $n=3$ ) aller markierten Zellen. In jüngeren Tieren (P0-2) konnte dagegen eine prozentual geringere Co-Expression von ChAT-eGFP und TRPM5 beobachtet werden. So wiesen in Tieren im Alter von P0-P2 nur  $45 \pm 3\%$  der TRPM5-positiven Zellen eine Co-Expression von ChAT-eGFP auf. ChAT-eGFP-positiv, aber TRPM5-negative Zellen konnten dagegen nicht beobachtet werden ( $n=10$ ). In adulten Tieren ( $p>78$ ) dagegen waren  $89 \pm 5\%$  ( $n=4$ ) der TRPM5-positiven Zellen ebenfalls ChAT-eGFP positiv ( $p=0,0011$ , Mann-Whitney-U-Test) (Abb. 52A und B). Dementsprechend war die Anzahl der TRPM5-positiven im Vergleich zu den ChAT-eGFP-positiven Zellen in den jungen Tieren höher (Abb. 52C).

Abschließend lässt sich aus diesem Abschnitt zusammenfassen, dass SCCC schon von Geburt an im Trachealepithel zu finden sind und in der Anzahl kein Unterschied zwischen

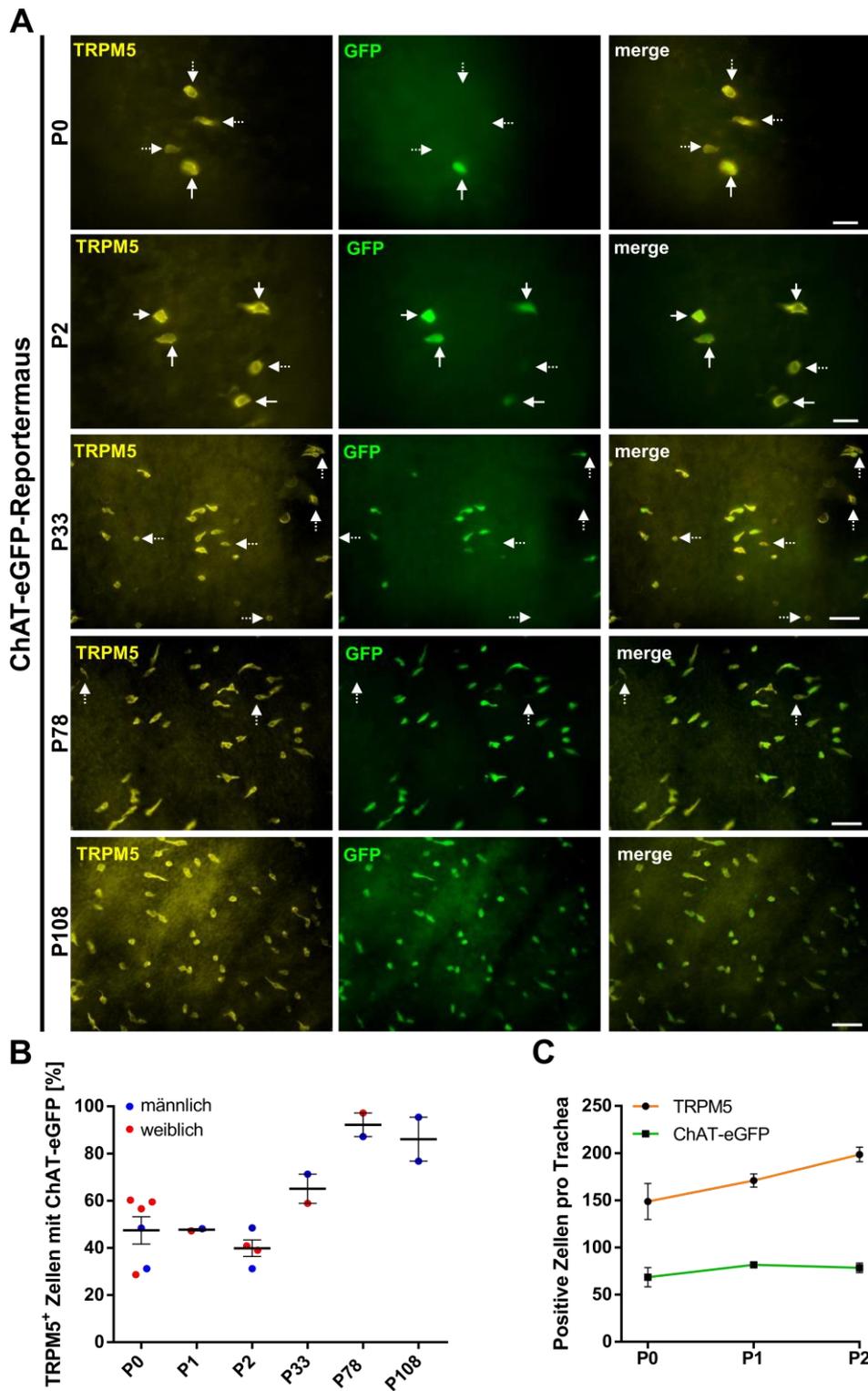
männlichen und weiblichen Tieren besteht. Jüngere Tiere wiesen jedoch eine verringerte Co-Expression von ChAT-eGFP und TRPM5 in SCCC auf.



**Abbildung 50: Anzahl der SCCC in Tracheen von *ChaT*-eGFP-Mäusen.** **A** IHC an *Whole-mount*-Präparaten, endogenes eGFP-Signal wurde mittels Antikörper gegen GFP verstärkt. Pfeile markieren GFP-positive SCCC. Falschfarbendarstellung. **B**: Hellfeldaufnahme von Tracheen von ChAT-eGFP-Mäusen, links einen Tag altes Tier, rechts adultes Tier (4 Monate alt). Maßstabsbalken: A: 50  $\mu\text{m}$ ; B: 1 mm. **C**: Fläche der in D und E analysierten *Whole-mount*-Präparate. **D**: Anzahl der ChAT-eGFP-positiven Zellen in *Whole-mount*-Präparaten. **E**: Anzahl der ChAT-eGFP-positiven Zellen pro Fläche ( $\text{mm}^2$ ) in *Whole-mount*-Präparaten. **C-E**: Mittelwert  $\pm$  SEM. **D-E**: Blaue Punkte symbolisieren Tracheen von männlichen Tieren, rote Punkte von weiblichen Tieren. **A, C, D, E**: Modifiziert aus Perniss et al. 2021.



**Abbildung 51: SCC in Embryonen von *ChAT*-eGFP-Reportermausen.** **A:** Giemsa-Färbungen von Sagittalschnitten von Embryonen verschiedenen Alters des von Engelhardt und KollegInnen beschriebenen Mausstammes. Gestrichelte Boxen markieren die Bereiche, welche in B (Rückenmark) und C (Trachea) dargestellt sind. **B:** IHC von Sagittalschnitten im Bereich des Rückenmarkes der Embryonen exemplarisch dargestellt in A. Endogenes eGFP-Signal wurde mittels Antikörper gegen GFP verstärkt. Pfeilköpfe markieren eGFP-positive Motoneurone im Rückenmark. Maßstabsbalken: 100  $\mu$ m. **C:** IHC von Sagittalschnitten exemplarisch in A dargestellt im Bereich der Trachea der Embryonen. Endogenes eGFP-Signal wurde mittels Antikörper gegen GFP verstärkt. Pfeile markieren eGFP- und TRPM5-positive Zellen im Trachealepithel von Embryonen im Alter von E18 und Tieren kurz nach der Geburt (P0). Sternchen markieren subepithelial gelegene eGFP-positive Nervenfasern. Maßstabsbalken: 100  $\mu$ m. Modifiziert aus Perniss et al. 2021.



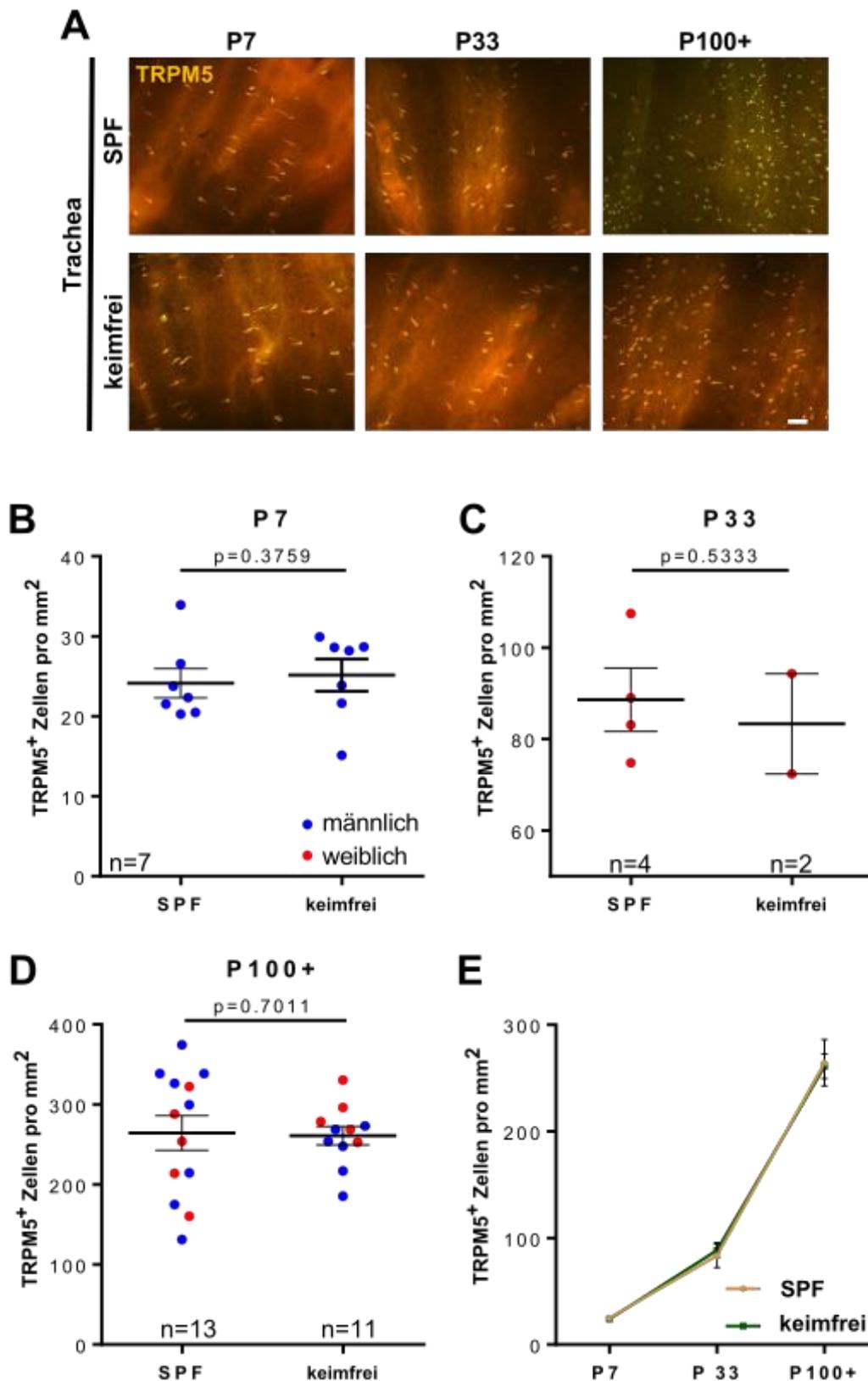
**Abbildung 52: Co-Expression von ChAT-eGFP und TRPM5 in Tracheen von ChAT-eGFP-Mäusen.** **A** IHC an *Whole-mount*-Präparaten, endogenes eGFP-Signal wurde mittels Antikörper gegen GFP verstärkt. Durchgezogene Pfeile markieren SCCC, welche sowohl TRPM5- als auch ChAT-eGFP-positiv sind. Gestrichelte Pfeile markieren Zellen, welche nur TRPM5-positiv sind. Maßstabsbalken: P0-2: 20  $\mu$ m; P33-108: 50  $\mu$ m. Falschfarbendarstellung. **B**: Quantifizierung der in A exemplarisch dargestellten *Whole-mount*-Präparate. Dargestellt ist die prozentuale Co-Expression von TRPM5 und ChAT-eGFP. **C**: Absolute Zellzahlen der in B dargestellten prozentualen Auswertung. B-C: Mittelwert  $\pm$  SEM. Modifiziert aus Perniss et al. 2021.

### 3.3.2 SCCC in Abhängigkeit von der Mikrobiota des Versuchstieres

#### 3.3.2.1 Anzahl der SCCC in gnotobiotischen Mäusen

Gnotobiotische (keimfreie) Mäuse (C57Bl6/N) wurden vom Deutschen Institut für Ernährungsforschung (DIFE, Potsdam, Rehbrücke) zur Verfügung gestellt. Diese Tiere wurden unter aufwändigen Bedingungen „keimfrei“ gehalten, dies bedeutet, dass diese Tiere keine Mikrobiota besitzen. Futter sowie Einstreu und Wasser wurden autoklaviert oder bestrahlt, um so eine Kontamination mit lebenden Mikroben zu vermeiden.

Für die Analyse der Anzahl an SCCC wurden tracheale *Whole-Mount*-Präparate hergestellt und mit Antikörpern gegen TRPM5 immunhistochemisch untersucht. Es wurden drei verschiedene Altersgruppen untersucht: 7 und 33 Tage alte Tiere sowie adulte Tiere (>5 Monate). Dabei konnten in keiner Altersgruppe Unterschiede in der Anzahl der SCCC in gnotobiotischen Mäusen im Vergleich zu konventionellen unter SPF-Bedingungen gehaltenen Mäusen festgestellt werden (Abb. 53). So lag die Anzahl von SCCC pro mm<sup>2</sup> in den Tracheen von 7 Tage alten Tieren bei  $24 \pm 2$  Zellen in SPF-Mäusen und bei  $25 \pm 2$  Zellen in keimfreien Mäusen ( $n=7$ ;  $p=0,3759$ ; Mann-Whitney-U-Test) (Abb. 53B). Die Anzahl von SCCC pro mm<sup>2</sup> lag in den Tracheen von 33 Tage alten Tieren bei  $89 \pm 7$  Zellen in SPF-Mäusen ( $n=4$ ) und bei  $83 \pm 11$  Zellen in keimfreien Mäusen ( $n=2$ ,  $p=0,5333$ ; Mann-Whitney-U-Test) (Abb. 53C). Die Anzahl von SCCC pro mm<sup>2</sup> lag in den Tracheen von adulten Tieren bei  $265 \pm 22$  Zellen in SPF-Mäusen ( $n=13$ ) und bei  $261 \pm 11$  Zellen in keimfreien Mäusen ( $n=11$ ) ( $p=0,7011$ ; Mann-Whitney-U-Test) (Abb. 53D; Appendix Tab. 12).



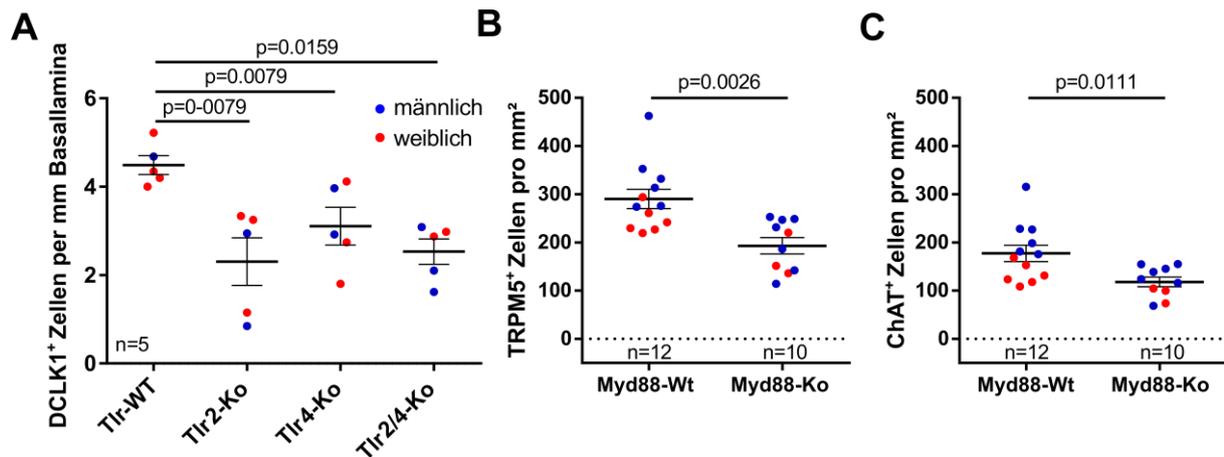
**Abbildung 53: Anzahl von SCCC in „keimfreien Mäusen“.** **A:** IHC mit Antikörpern gegen TRPM5 an *Whole-mount*-Präparaten von keimfreien Mäusen und Mäusen aus SPF-Haltung. Maßstabsbalken: 50  $\mu$ m. Farbameraufnahmen, Darstellung der Originalfarben **B-D:** Quantifizierung der in A exemplarisch dargestellten *Whole-mount*-Präparate in B: 7 Tage alte Tiere, C: 33 Tage alte Tiere, D: adulte Tiere, Mann-Whitney-U-Test. **E:** Zusammenfassung der Graphen B-D. B-E: Mittelwert  $\pm$  SEM. Modifiziert aus Perniss et al. 2021.

3.3.2.2 Anzahl der SCCC in *Myd88*-, *TLR2*-, *TLR4*- und *TLR2/4*-defizienten Mäusen

Als nächstes wurde untersucht, ob das Fehlen von *Toll-like*-Rezeptoren (*TLR2* und *TLR4*) und des Proteins *MyD88* einen Einfluss auf die Entwicklung von SCCC in der Trachea hat. *MyD88* ist ein Protein, welches im Signalweg von TLR (außer *TLR3*) eine essentielle Rolle einnimmt. TLR werden durch von Bakterien sezernierte Produkte (PAMPs) oder von Bestandteilen der Bakterien selbst stimuliert (Kawasaki und Kawai 2014). Es wurden vier verschiedene Mausstämme genutzt, welche vom Deutschen Institut für Ernährungsforschung (DIFE, Potsdam, Rehbrücke) zur Verfügung gestellt wurden. Dabei handelte es sich um den Mausstamm C57BL/10ScN-*TLR4* (*Tlr4*-Ko), dieser weist eine natürliche Defizienz des *Tlr4* auf, den Mausstamm C57BL/10ScSn-*TLR2*<sup>tm1</sup> (*Tlr2*-Ko) und einer Kreuzung aus diesen beiden Mausstämmen (*Tlr2/4*-Ko) sowie um Kontrollmäuse aus der gleichen Zucht (*Tlr*-Wt). Der Mausstamm B6.129-*Myd88*<sup>tm1</sup>Aki (*Myd88*-Ko) und dazu korrespondierende Wildtypen wurden von zwei verschiedenen Instituten zur Verfügung gestellt: zum einen von der Medizinischen Klinik für Gastroenterologie, Infektiologie und Rheumatologie der Charité (Berlin), und zum anderen vom Institut für Pathologie der Universität Marburg.

Im Rahmen dieser Untersuchungen zeigte sich, dass *Tlr2*- ( $p=0,0079$ ), *Tlr4*- ( $p=0,0079$ ), *Tlr2/4*- ( $p=0,0159$ ) und *Myd88*-defiziente Mäuse ( $p=0,0026$ ) eine geringere Anzahl an SCCC im Vergleich zu den jeweiligen Kontrolltieren aufwiesen. So lag die Anzahl von DCLK1-positiven Zellen pro mm Basallamina in Paraffinschnitten von *Tlr*-Wt Tieren bei  $4,5 \pm 0,2$ , bei *Tlr2*-Ko-Tieren bei  $2,3 \pm 0,8$ ; dies entspricht einer Reduktion um 49% im Vergleich zum Wildtyp. In *Tlr4*-Ko-Tieren lag die Zellzahl bei  $3,1 \pm 0,4$  (Reduktion um 31%) und bei *Tlr2/4*-Ko Tieren bei  $2,5 \pm 0,3$  (Reduktion um 44%) ( $n=5$  je Gruppe) (Abb. 54A; Appendix Tab. 13). Die Anzahl von TRPM5-positiven Zellen pro mm<sup>2</sup> lag in *Whole-mount*-Präparaten von *Myd88*-Wt-Tieren bei  $290 \pm 20$  ( $n=12$ ) und bei *Myd88*-Ko-Tieren bei  $193 \pm 17$  ( $n=10$ ) Zellen pro mm<sup>2</sup> ( $p=0,0026$ , Mann-Whitney-U-Test), dies entspricht einer Reduktion um 33% im Vergleich zum Wildtyp. Die Anzahl von ChAT-positiven Zellen pro mm<sup>2</sup> in *Whole-mount*-Präparaten von *MyD88*-Wt-Tieren lag bei  $177 \pm 1$  ( $n=12$ ) und bei *MyD88*-Ko-Tieren bei  $118 \pm 10$  ( $n=10$ ) Zellen pro mm<sup>2</sup> ( $p=0,0011$ , Mann-Whitney-U-Test), dies entspricht ebenfalls einer Reduktion um 33% im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 54B und C; Appendix Tab. 14).

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass eine Stimulation des TLR-Signalweges die Anzahl von SCCC in der Trachea beeinflusst. Das Vorhandensein lebender Mikrobiota ist dazu jedoch nicht notwendig.



**Abbildung 54: Anzahl von SCCC in Tracheen von *Tlr*- und *Myd88*-defizienten Mäusen.**  
**A:** Auswertung von IHC-Markierungen mit Antikörpern gegen DCLK1 an Paraffinschnitten von *Tlr*-Wt-, *Tlr2*-Ko-, *Tlr4*-Ko- und *Tlr2/4*-Ko-Mäusen. **B:** Auswertung von IHC-Markierungen mit Antikörpern gegen TRPM5 an *Whole-Mount*-Präparaten von *Myd88*-Wt- und *Myd88*-Ko-Mäusen. **C:** Auswertung von IHC-Markierungen mit Antikörpern gegen ChAT an *Whole-Mount*-Präparaten von *Myd88*-Wt- und *Myd88*-Ko-Mäusen. **A-C:** Mittelwert  $\pm$  SEM, Mann-Whitney-U-Test. Modifiziert aus Perniss et al. 2021.

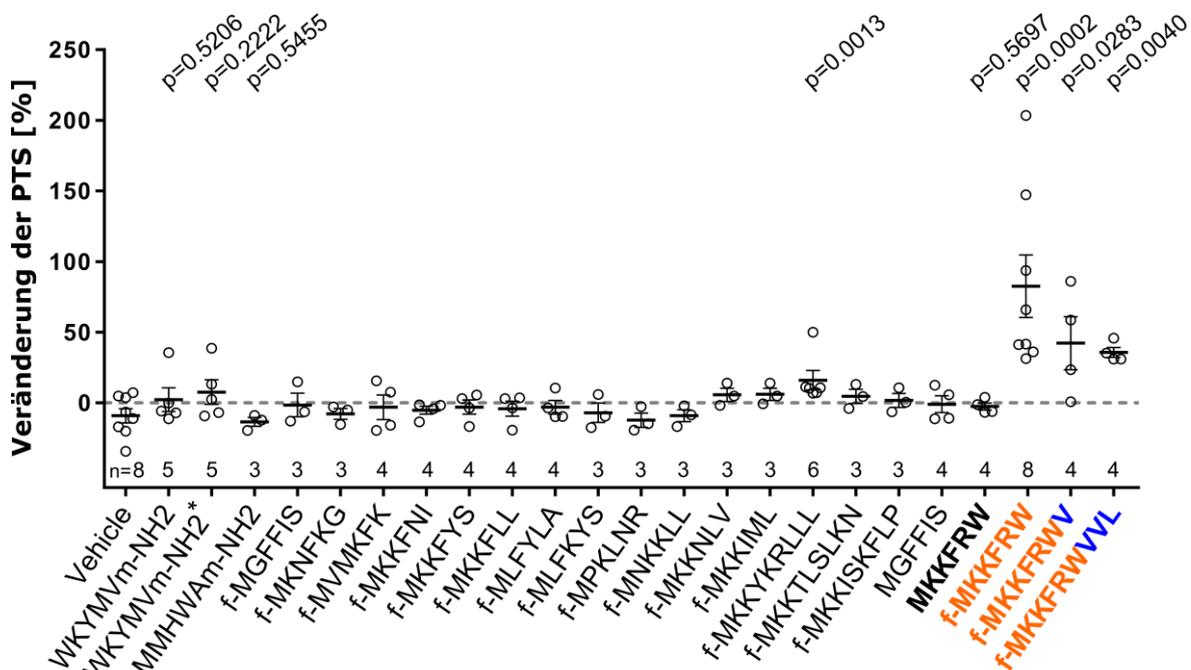
### 3.4 Einfluss bakterieller Peptide auf den zilienabhängigen Partikeltransport

Im Nachfolgendem wurde untersucht, ob Produkte von Bakterien oder Bestandteile von Bakterien einen Einfluss auf die Schlagfrequenz zilientragender Zellen in der Trachea der Maus und somit auf die MC haben. Diese bakteriellen Produkte können entweder aktiv von Bakterien sezerniert werden, z.B. *Quorum sensing*-Moleküle von *Pseudomonas aeruginosa* (zusammengefasst von Lee und Zhang 2015) und formylierte Peptide (zusammengefasst von Bufe und Zufall 2016) oder durch die Lyse von Bakterien freigesetzt werden. Hierzu wurde die Trachea von Mäusen explantiert und die Geschwindigkeit, mit der sich applizierte Partikel über die Epitheloberfläche bewegen, ermittelt (PTS). Zusätzlich wurde die Schlagfrequenz der zilientragenden Zellen im Trachealepithel bestimmt.

#### 3.4.1 Einfluss von bakteriellen Signalpeptiden auf die MC

Um zu untersuchen, ob bakterielle Signalpeptide, welche entweder formyliert oder nicht formyliert vorliegen können, einen Einfluss auf die MC haben, wurden zuerst N-terminale Fragmente von 18 Signalpeptiden getestet. Dabei handelte es sich um Peptide bestehend aus 4–9 AS, 16 Peptide lagen formyliert und zwei Peptide unformyliert vor (Abb. 55). Zudem wurden zwei bekannte FPR-Agonisten getestet, welche die FPR der Maus Fpr1, Fpr2 (FPR-rs2) und Fpr3 (FPR-rs1, FPR3 oder LXA4R) aktivieren. Dabei handelte es sich um das W-Peptid (WKYVM-NH<sub>2</sub>) und das M-Peptid (MMHWAm-NH<sub>2</sub>) (Bufe et al. 2015). Im Vergleich zu der Applikation von Puffer (*vehicle*) führte nur die Applikation der Signalpeptide mit der AS-Sequenz f-MMYKRLLL ( $p=0.0013$ ;  $n=6$ ; Mann-Whitney-U-Test) und f-MKKFRW ( $p=0,002$ ;

n=8; Mann-Whitney-U-Test), beide in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$ , zu einer Steigerung der PTS. Die Applikation der beiden FPR-Agonisten dagegen führte zu keiner Änderung der PTS (W-Peptid: 10  $\mu\text{M}$ ,  $p=0,5206$ ,  $n=5$ ; 100  $\mu\text{M}$ ,  $p=0,2222$ ,  $n=5$ ; M-Peptid: 10  $\mu\text{M}$ ,  $p=0,5455$ ,  $n=3$ , Mann-Whitney-U-Test). Zusätzlich wurden zwei Varianten des PTS-erhöhenden Peptides f-MKKFRW getestet, welche jeweils um eine (f-MKKFRWV) oder drei AS (f-MKKFRWVVL) verlängert wurden. Beide Varianten führten ebenfalls zu einer Erhöhung der PTS ( $n=4$ ;  $p=0,0283$  und  $p=0,0040$ ; Mann-Whitney-U-Test). Die unformylierte Variante von f-MMKFRW (MKKFRW) führte dagegen zu keiner Änderung der PTS ( $p=0,5697$ ;  $n=4$ ; Mann-Whitney-U-Test) (Abb. 55; Appendix Tab. 15). Die eingesetzten Signalpeptide wurden anhand ihrer bekannten Wirkung als Agonisten für den Fpr1 und Fpr2 ausgewählt (Bufe et al. 2015) und repräsentieren dabei den N-Terminus von >1754 Proteinen, welche in insgesamt 18.808 Bakterienstämmen zu finden sind (Tab. 24).



**Abbildung 55: Veränderung der PTS nach Applikation von FPR-Agonisten und formylierten bakteriellen Signalpeptiden.** Dargestellt ist die Veränderung der PTS nach Applikation (8 min) der FPR-Agonisten, WKYMVm-NH2 (W-Peptid 10 und 100  $\mu\text{M}$ \*) und MMHWAm-NH2 (M-Peptid, 10  $\mu\text{M}$ ) und von formylierten und nicht formylierten bakteriellen Signalpeptiden. Alle Peptide wurden in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Orange hinterlegt ist die AS-Sequenz f-MKKFRW, welche zu einer Steigerung der PTS führt, blau hinterlegt sind AS welche an die AS-Säuresequenz f-MKKFRW angehängt wurden, fett hinterlegt ist das nicht formylierte Peptid mit gleicher AS-Säuresequenz. Dargestellt sind Mittelwert  $\pm$  SEM. Der Effekt der Substanzen wurde im Vergleich zur Applikation des gleichen Volumens an C1-Puffer (*vehicle*) untersucht (Mann-Whitney-U-Test). Modifiziert aus Perniss et al. 2020b.

Das formylierte Peptid f-MKKFRW (10  $\mu\text{M}$ ) erhöhte die PTS innerhalb von 8 min von  $47 \pm 3 \mu\text{m/s}$  auf  $82 \pm 6 \mu\text{m/s}$ , dies entspricht einer Erhöhung um  $83 \pm 21 \%$  ( $p < 0,0001$ ;  $n=12$ ; Mann-Whitney-U-Test) (Abb. 56A-C; Appendix Tab. 16). Eine durchgeführte

Konzentrationsreihe (0,1  $\mu\text{M}$  – 100  $\mu\text{M}$ ) ergab eine  $\text{EC}_{50}$  von 0,9  $\mu\text{M}$  (Abb. 56D; Appendix Tab. 17). Anhand dieser wurde in folgenden Versuchen stets eine Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  f-MKKFRW eingesetzt, um eine maximale Stimulation der PTS zu erreichen. Um auszuschließen, dass die beobachtete Erhöhung der PTS durch f-MKKFRW, z.B. durch Verunreinigungen bei der Herstellung oder Verdünnung des Peptides, hervorgerufen wurde, erfolgte die Applikation eines Peptids mit der gleichen AS-Sequenz, welches aber von einem anderen Hersteller bezogen wurde. In diesem Experiment konnte kein Unterschied zwischen beiden Substanzen (10  $\mu\text{M}$ ) beobachtet werden ( $p=0,1228$ ;  $n=12$  und 6, Mann-Whitney-U-Test) (Abb. 56E; Appendix Tab. 18). Um das AS-Sequenzmotiv, welches zu einer Erhöhung der PTS führt, weiter einzugrenzen, wurden Varianten von f-MKKFRW getestet, in denen entweder einzelne AS substituiert oder die AS-Sequenz verlängert bzw. verkürzt wurde. Dabei zeigte sich, dass sowohl das um eine AS verkürzte Peptid f-MKKFR als auch das Peptid mit einer substituierten AS f-MMKFR $\underline{\text{Y}}$  zu einer Erhöhung der PTS führte ( $p=0,0009$ ;  $p=0,0005$ ;  $n=5$ ; Mann-Whitney-U-Test). Des Weiteren resultierte auch die Applikation des Peptides f-MKKFK $\underline{\text{WSI}}$  in einer Erhöhung der PTS ( $p=0,0005$ ;  $n=5$ ; Mann-Whitney-U-Test) (Abb. 56F). Dagegen führten Versuche mit den Peptiden f-MKK $\underline{\text{WRW}}$ , f-MKK $\underline{\text{HRW}}$  und f-MK $\underline{\text{RFVWII}}$  zu keiner Steigerung der PTS ( $p=0,0564$ ,  $n=3$ ; Mann-Whitney-U-Test) (Abb. 56F; Appendix Tab. 19). Aus diesen Versuchen lässt sich schließen, dass das Kernmotiv, welches für eine Steigerung der PTS notwendig ist, aus den AS f-MKKF besteht. Dieses Peptid wurde jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht getestet.

**Tabelle 24: *In silico*-Analyse der Gensequenzen von Bakterien.** Untersucht wurde, welche Bakterien die untersuchten Peptidsequenzen aufweisen und in welchen und wie vielen Proteinen diese zu finden sind. Modifiziert aus Perniss et al. 2020b.

Sequenz	Anzahl der Stämme*	Anzahl der Proteine	Typische Proteine**	Publizierter Name
<b>MKKFRW</b>	<b>454</b>	<b>31</b>	PhoP/PhoQ regulator MgrB Type VII secretion protein EsaA Spermidine/putrescine ABC transporter	****
<b>MGFFIS</b>	<b>94</b>	<b>16</b>	Sec translocon accessory complex HMGL-like protein Hyaluronidase	Streptococcus-SP1***
<b>MKKISKFLP</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	SHP2/SHP3 family peptide pheromone	****
<b>MKKTLSLKN</b>	<b>6</b>	<b>1</b>	Competence stimulating peptide	****
<b>MKKYKRLLL</b>	<b>94</b>	<b>3</b>	Membrane protein insertase YidC	****
<b>MKKIML</b>	<b>2537</b>	<b>&gt;300</b>	PTS sugar transporter subunit IIB UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase Porin family protein	Listeria-SP18***
<b>MKKNLV</b>	<b>914</b>	<b>&gt;300</b>	Cytidylate kinase NAD-dependent protein deacylase WxL domain-containing protein	Clostridium-SP13***
<b>MNKKLL</b>	<b>4725</b>	<b>&gt;300</b>	Porin Outer membrane protein Internalin	Staphylococcus-SP12***
<b>MPKLR</b>	<b>154</b>	<b>53</b>	Hemolysin ATP synthase gamma chain	Vibrio-SP10***
<b>MLFKYS</b>	<b>35</b>	<b>15</b>	ABC transporter permease Uncharacterized protein (DUF2147 family)	Shewanella-SP7***
<b>MLFYLA</b>	<b>53</b>	<b>18</b>	LrgB family protein HicB family protein tRNA-dihydrouridine synthase (EC 1.3.1.-)	Desulfotomaculum-SP8***
<b>MKKFLL</b>	<b>8098</b>	<b>&gt;300</b>	Flagellar basal body rod protein Outer membrane immunogenic protein Thiol at disulfide interchange protein	Hydrogenobacter-SP16***
<b>MKKFYS</b>	<b>788</b>	<b>134</b>	SPI-1 type III secretion system invasion I ipoprotein InvH Por secretion system C-terminal sorting domain HlyD family secretion protein	Salmonella-SP1***
<b>MKKFNI</b>	<b>573</b>	<b>210</b>	6-phospho-alpha-glucosidase Biotin carboxyl carrier protein Maltose-6-phosphate glucosidase	****
<b>MVMKFK</b>	<b>31</b>	<b>15</b>	Carboxy terminal-processing peptidase (EC 3.4.21.102) MerR family transcriptional regulator Tail-specific protease (EC 3.4.21.102)	Haemophilus-SP5***
<b>MKNFKG</b>	<b>249</b>	<b>56</b>	Peptidase Microbial collagenase 4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate synthase (EC 4.3.3.7)	Bacillus-SP2***

- Aufgelistet sind nur Bakterienstämme, welche ein Protein besitzen das mit diesen Sequenzen am N-terminus beginnt

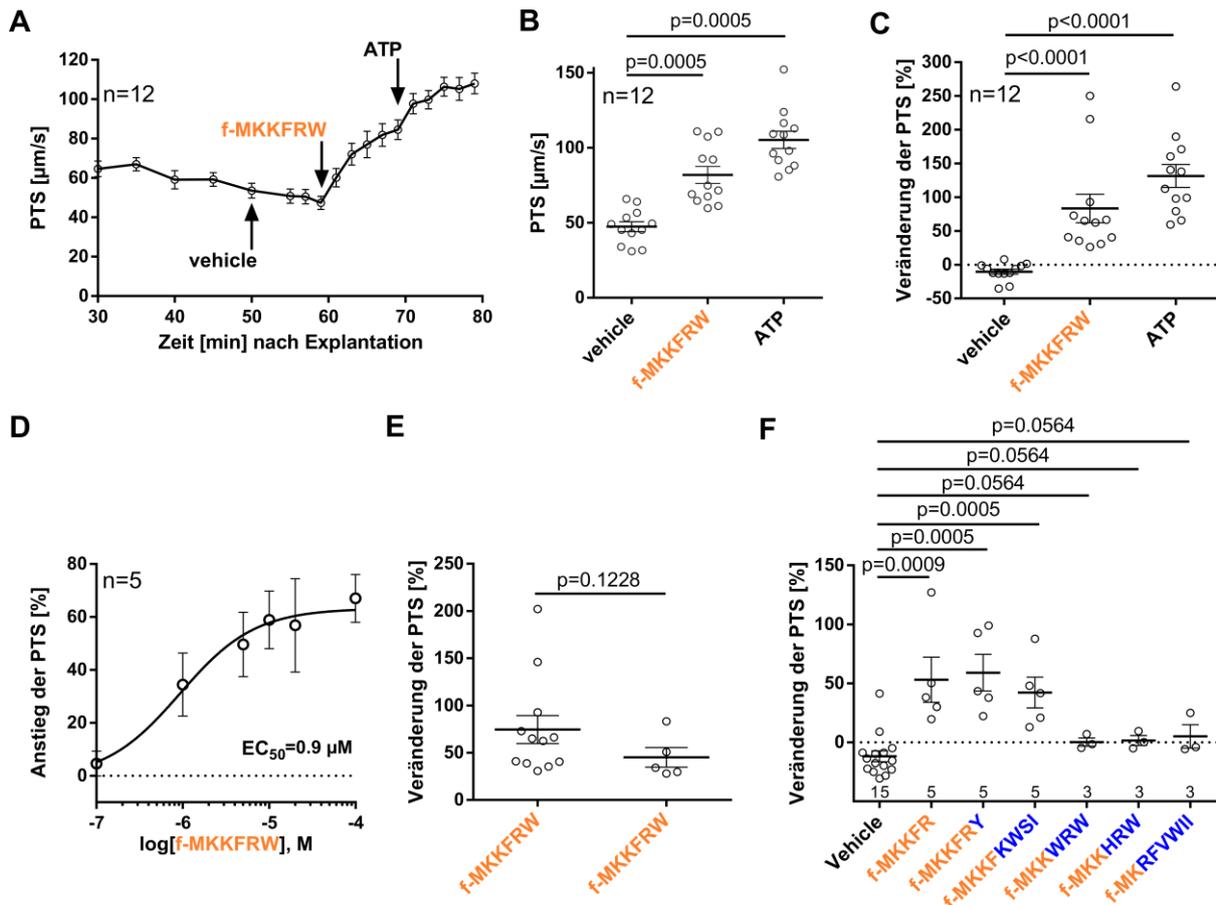
\*\*\* Bufe et al. 2015

\*\*\*\* Bufe et al. 2019

- \*\* Aufgelistet sind die am häufigsten vorhandenen Proteine

Σ >1.754 Proteine

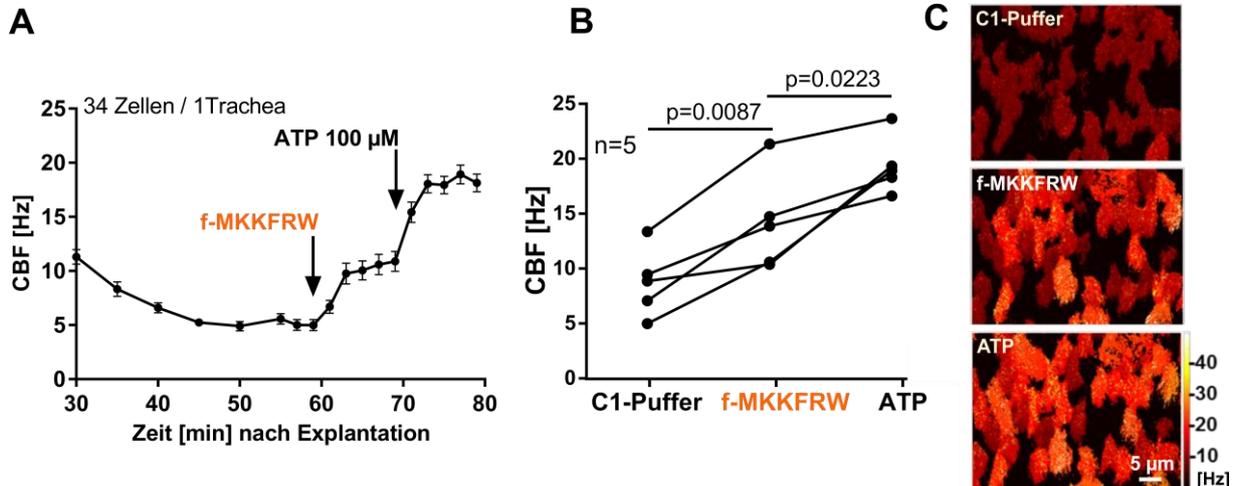
Σ 18.808 Bakterienstämme



**Abbildung 56: Veränderung der PTS nach Applikation von f-MKKFRW oder Varianten dieses Signalpeptides.** **A:** Dargestellt ist der Kurvenlauf eines Experimentes bestehend aus Messungen an zwölf Tracheen. Die Applikation von f-MKKFRW und ATP, welches als Kontrollsubstanz diente, führt zu einem Anstieg der PTS, welcher in B und C abgebildet ist. **B:** Auswertung des Experimentes dargestellt in A, abgebildet sind die Transportgeschwindigkeiten 8 min nach Applikation von f-MMKFRW und ATP **C:** Auswertung des Experimentes dargestellt in A, dargestellt ist die prozentuale Veränderung der PTS durch Applikation von C1-Puffer (*vehicle*), f-MKKFRW und ATP, 8 min nach Applikation. **D:** Dosis-Wirkungs-Kurve nach Applikation von f-MKKFRW (8 min). **E:** Veränderung der PTS nach Applikation von f-MKKFRW aus zwei verschiedenen Bezugsquellen, Peptid links dargestellt entspricht den Versuchen abgebildet in A-C, Peptid rechts im Graphen dargestellt, entspricht dem Kontrollpeptid von einem anderen Hersteller. **F:** Veränderung der PTS nach Applikation von Varianten des formylierten Peptides f-MKKFRW, Änderungen in der AS-Sequenz im Vergleich zu f-MKKFRW sind in blau dargestellt. **A-F:** Mittelwert  $\pm$  SEM. **B:** Wilcoxon-Rangsummentest. **C, E, F:** Mann-Whitney-U-Test. **A, D, F:** Modifiziert aus Perniss et al. 2020b.

Die PTS kann akut durch mehrere Parameter beeinflusst werden, z.B. durch die Viskosität des Flüssigkeitsfilms über den zilientragenden Zellen, die Umgebungstemperatur und in erster Linie durch die Schlagfrequenz der zilientragenden Zellen. Die Temperatur sowie die Viskosität der Flüssigkeit waren in diesem experimentellen Design stets gleich. Um zu untersuchen, ob das Signalpeptid f-MKKFRW einen Einfluss auf die Schlagfrequenz der zilientragenden Zellen hatte, wurde diese mit Hilfe des gleichen experimentellen Setups wie zur Bestimmung der PTS ermittelt. Dabei zeigte sich, dass sowohl die Applikation von f-

MKKFRW (von  $8,7 \pm 1,4$  Hz auf  $14,2 \pm 2$  Hz; Steigerung um  $69,3 \pm 17,9$  %) als auch die von ATP (auf  $19,4$  Hz  $\pm 1,2$  Hz; Steigerung um  $142,7 \pm 37,4$  %), welches auch hier als Positivkontrolle diente, die Schlagfrequenz der zilienträgenden Zellen erhöht ( $p=0,0087$ ;  $p=0,0006$ ; gepaarter t-Test;  $n=5$ ) (Abb. 57; Appendix Tab. 20).



**Abbildung 57: Veränderung der CBF nach Applikation von f-MKKFRW.** **A:** Dargestellt ist der Verlauf der gemittelten CBF von 34 zilienträgenden Zellen einer Trachea über die Zeit. **B:** Dargestellt ist die gemittelte CBF von insgesamt 5 Tracheen, ein Datenpunkt entspricht einer analysierten Trachea vor Applikation von f-MKKFRW (C1-Puffer), 8 min nach f-MKKFRW (f-MKKFRW,  $p=0,0087$ ) und 8 min nach ATP ( $p=0,0223$ ) ( $n=5$ ; gepaarter t-Test). **C:** Darstellung der Oberfläche der Trachea. Falschfarbendarstellung der CBF, eine hellere Färbung entspricht einer höheren CBF, jeweils 8 min nach Applikation von f-MKKFRW und ATP. **B, C:** Modifiziert aus Perniss et al. 2020b.

Eine *in silico*-Analyse von Sequenzierungsdaten unter Verwendung der Datenbank *UniProt* zeigte, dass eine Vielzahl von Bakterien Gensequenzen enthalten, die für das Motiv MKKFR und die anderen Peptide, welche einen Einfluss auf die PTS zeigten, codieren. Darunter sind Bakterien, die klassische Pathogene darstellen, welche Infektionen der Lunge und Atemwege im Menschen hervorrufen können. So konnte die Sequenz des Peptides MKKFRW in *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes* und *Escherichia coli* gefunden werden, das Peptid MKKFRY in dem Bakterium *Bordetella bronchiseptica* und die Sequenz MKKFKWSI in dem Bakterium *S. pneumoniae*. Das Kernmotiv mit der Sequenz MKKFR dagegen ist in einer Vielzahl von Pathogenen zu finden, darunter *S. pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Chlamydia pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* und *Escherichia coli* (Tabelle 25).

Zusammenfassend lässt sich aus diesen Versuchen festhalten, dass formylierte bakterielle Signalpeptide einen Einfluss auf die PTS aufweisen. Dies ist jedoch kein Klasseneffekt, sondern begrenzt auf bestimmte Sequenzmotive (beginnend mit f-MKKF), welche auch in pathogenen Bakterien zu finden sind.

**Tabelle 25: In silico-Analyse der Gensequenzen von Pathogenen.** Es wurden die Sequenzdaten von Bakterien untersucht, welche im Menschen Atemwegsinfektionen auslösen können. Dabei konnten in ein oder mehreren Pathogenen die Sequenzen der PTS-stimulierenden Peptide nachgewiesen werden. Modifiziert aus Perniss et al. 2020b.

Pathogen	MKKFRW	MKKFR	MKKFRY	MKKFKWSI
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	■	■	■	■
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	■	■	■	■
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	■	■	■	■
<i>Acinetobacter baumannii</i>	■	■	■	■
<i>Listeria monocytogenes</i>	■	■	■	■
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	■	■	■	■
<i>Escherichia coli</i>	■	■	■	■
<i>Chlamydia trachomatis</i>	■	■	■	■
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	■	■	■	■
<i>Klebsiella oxytoca</i>	■	■	■	■
<i>Pseudomonas maltophilia</i>	■	■	■	■
<i>Staphylococcus aureus</i>	■	■	■	■
<i>Streptococcus pyogenes</i>	■	■	■	■

■ vorhanden

■ nicht vorhanden

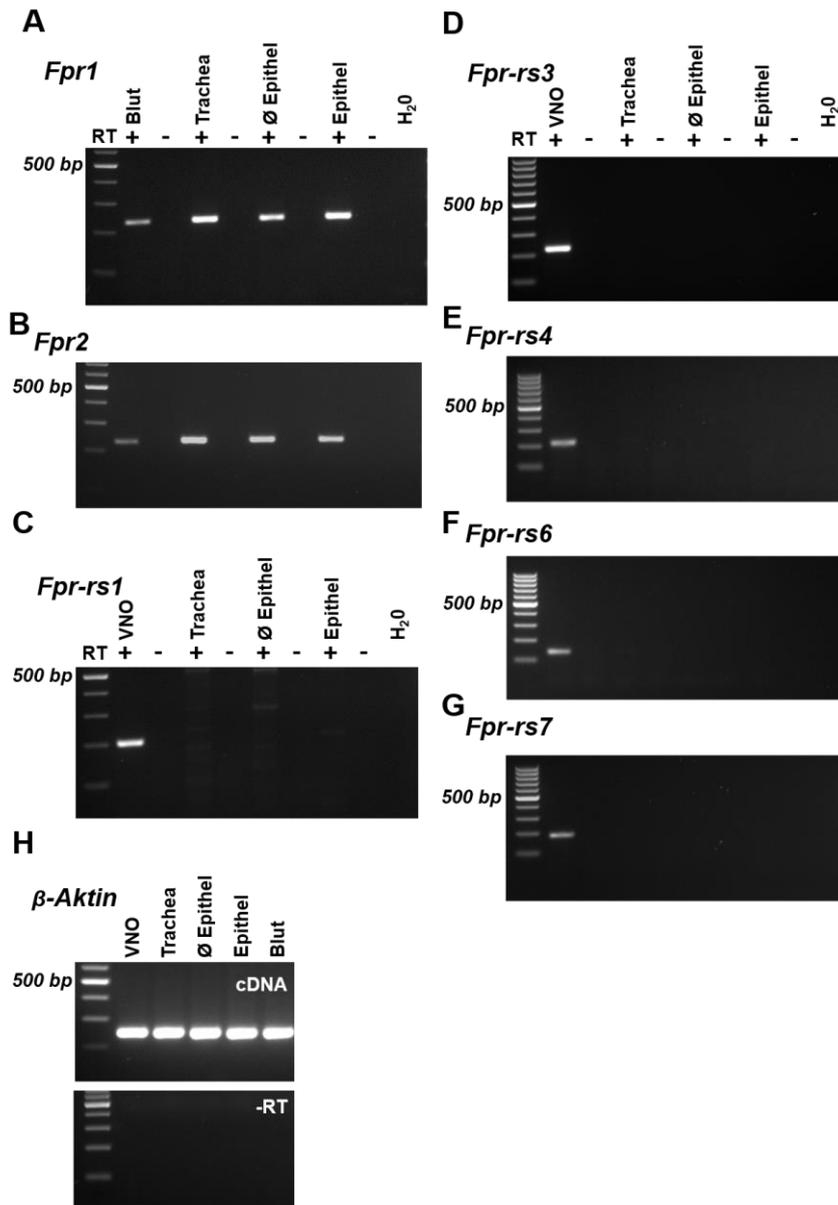
#### 3.4.1.1 Beteiligung von FPR an der Erhöhung der PTS durch bakterielle Signalpeptide

In der Maus sind sieben verschiedene Fpr vorhanden. Diese können in zwei Gruppen unterteilt werden: die klassischen Fpr, bestehend aus Fpr1 und Fpr2 (Fpr-rs2), und die ausschließlich im VNO der Maus zu findenden Fpr, bestehend aus Fpr (Fpr-rs1, Fpr3 oder LXA4R, Fpr-rs3, Fpr-rs4, Fpr-rs6 und Fpr-rs7). Die Expression der klassischen Fpr ist dagegen nicht auf das VNO beschränkt. So werden diese beiden Rezeptortypen in Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems exprimiert, vor allem in Monozyten, neutrophilen Granulozyten, dendritischen Zellen, T- und B-Lymphozyten, aber auch in Zellen, welche nicht primär dem Immunsystem zugeordnet werden können, wie Mikroglia-/Astrogliazellen des Gehirns, DRG-Neuronen und Hepatozyten (zusammengefasst von Migeotte et al. 2006). Die klassischen Fpr werden durch formylierte Signalpeptide aktiviert, für die nicht-klassischen Fpr außer dem Fpr3

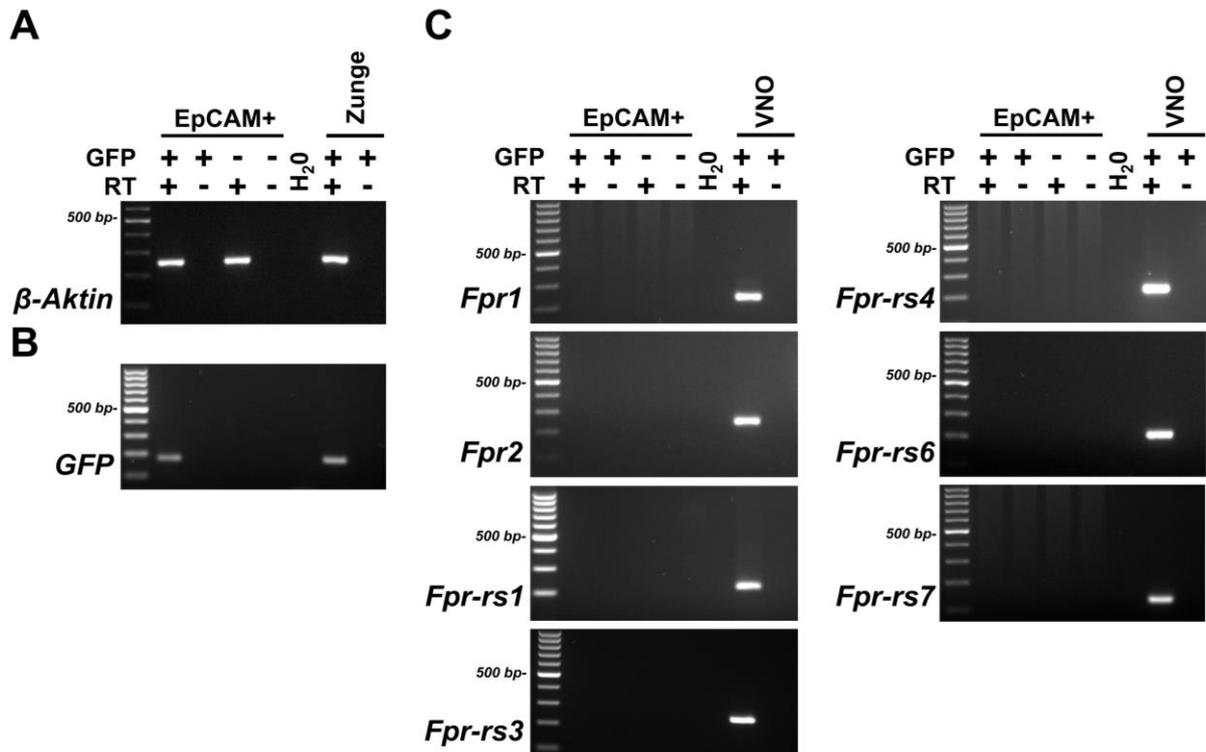
sind dagegen keine Liganden bekannt (Bufe et al. 2012; Bufo et al. 2015). Im Speziellen konnte gezeigt werden, dass das in dieser Arbeit verwendete Peptid f-MKKFRW als Ligand für den Fpr3 der Maus dient (Bufo et al. 2019). Die beobachtete Wirkung der getesteten formylierten Signalpeptide auf die MC legt eine Beteiligung von Fpr an der Erkennung dieser nahe. Aus diesem Grund wurde die Expression der Fpr in der Trachea genauer untersucht. Zudem wurden PTS-Experimente mit dem Peptid f-MKKFRW und Fpr1- und Fpr2-Inhibitoren sowie *Fpr1*- und *Fpr3*-Ko Mauslinien verwendet, um eine Beteiligung der Fpr zu untersuchen.

Die Expression der verschiedenen Fpr in der Trachea wurde mittels RT-PCR untersucht. Dabei zeigte sich, dass nur mRNA der klassischen Fpr1 und Fpr2 sowohl in der gesamten Trachea als auch in abgetragenem Trachealepithel sowie in dem darunterliegenden Gewebe zu finden war. Ebenso konnten diese in der verwendeten Positivkontrolle (Blut) nachgewiesen werden (Abb. 58A und B). Die mRNA der nicht klassischen Fpr (Fpr3, Fpr-rs3, Fpr-rs4, Fpr-rs6, Fpr-rs7) dagegen konnten nur in der Positivkontrolle (VNO) nachgewiesen werden (Abb. 58C-G).

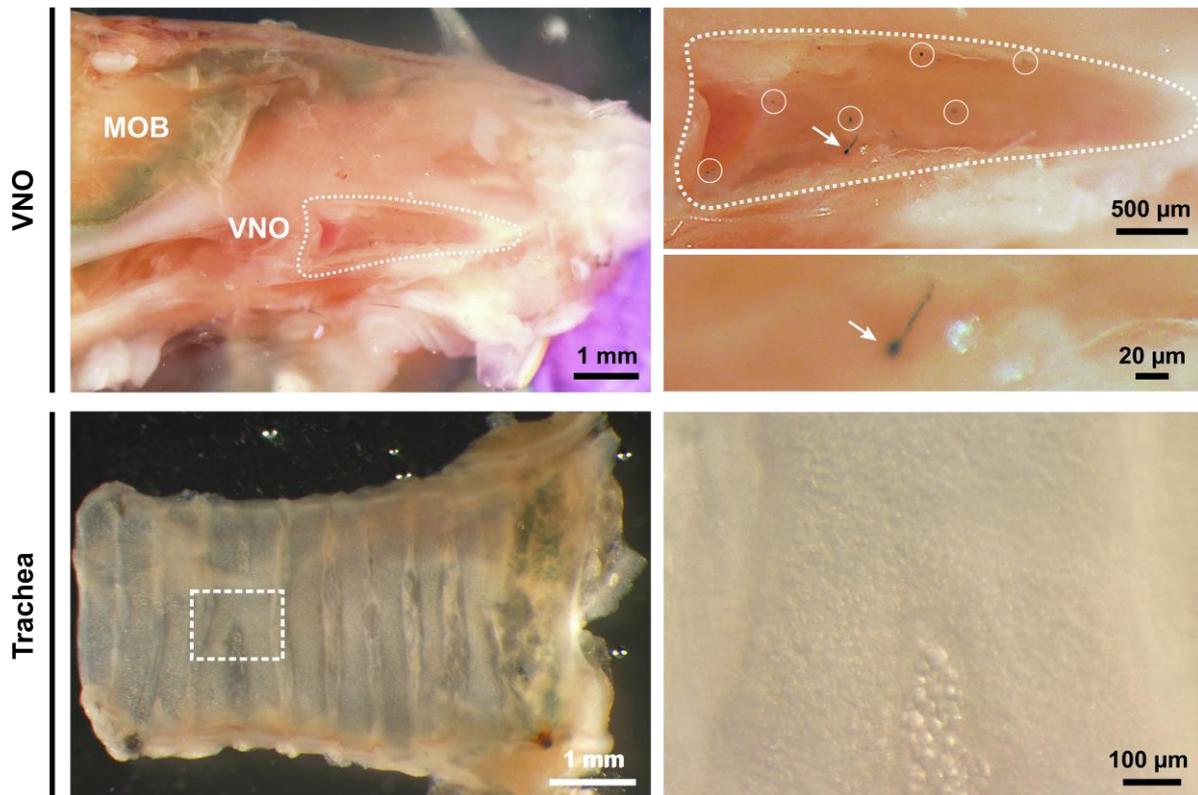
Zudem wurden Epithelzellen der Trachea analysiert. Hierzu wurde die Trachea verdaut, um den Zellverband aufzulösen, und einzelne Zellen isoliert. Anschließend erfolgte eine Trennung der Zellpopulationen mittels FACS und anschließender RNA-Isolation, cDNA-Synthese und RT-PCR aus den aufgefangenen Zellen. Die Isolation der Zellen erfolgte dabei aus *Trpm5*-eGFP-Tieren. In der hergestellten cDNA konnten weder in Epithelzellen (EpCAM+, CD45-, GFP-) noch in isolierten SCCC (EpCAM+, Cd45 *low*, GFP+) mRNA-Transkripte für die Fpr nachgewiesen werden (Abb. 59). Zusätzlich wurde die Expression des Fpr3 unter Verwendung einer *Fpr3*-Ko Mauslinie untersucht. In dieser Linie wird anstatt der für den Fpr3 codierenden mRNA das Enzym  $\beta$ -Galactosidase exprimiert. Mittels einer histochemischen Färbung kann dieses Enzym sichtbar gemacht werden, indem dessen Aktivität nachgewiesen wird. Dabei werden  $\beta$ -Galactosidase-positive Strukturen blau angefärbt. In der Trachea von diesen Mäusen konnten keine positiven Zellen gefunden werden. Im VNO dagegen waren einzelne Zellen, vermutlich sensorische Neurone, blau angefärbt (N=3; Abb. 60).



**Abbildung 58: Expression von Fpr in der Trachea der Maus. A-H:** RT-PCR-Experimente mit Proben von Tracheen aus weiblichen C57BL/6-Mäusen. Trachea = gesamte Trachea; ø Epithel = Trachea von der das Epithel mittels eines Wattestäbchens abgetragen wurde; Epithel = abgetragenes Epithel. Das „+“ Zeichen entspricht dem PCR-Ansatz mit Reverser Transkriptase (RT), das „-“ Zeichen entspricht dem PCR-Ansatz ohne RT, H<sub>2</sub>O = PCR-Ansatz ohne cDNA. **A:** Ein PCR-Produkt spezifisch für den Fpr1 (228 bp) konnte in allen untersuchten Proben nachgewiesen werden. **B:** Ein PCR-Produkt spezifisch für den Fpr2 (226 bp) konnte in allen untersuchten Proben nachgewiesen werden. **C:** Ein PCR-Produkt spezifisch für den Fpr-rs1 (201 bp) konnte nur in der Positivkontrolle (VNO) nachgewiesen werden. **D:** Ein PCR-Produkt spezifisch für den Fpr-rs3 (226 bp) konnte nur in der Positivkontrolle (VNO) nachgewiesen werden. **E:** Ein PCR-Produkt spezifisch für den Fpr-rs4 (211 bp) konnte nur in der Positivkontrolle (VNO) nachgewiesen werden. **F:** Ein PCR-Produkt spezifisch für den Fpr-rs6 (137 bp) kann nur in der Positivkontrolle (VNO) nachgewiesen werden. **G:** Ein PCR-Produkt spezifisch für den Fpr-rs7 (185 bp) konnte nur in der Positivkontrolle (VNO) nachgewiesen werden. **H:** Die Amplifikation von  $\beta$ -Aktin mRNA diente als Kontrolle für die erfolgreiche Synthese der cDNA aller Proben. In allen untersuchten Proben mit Reverser Transkriptase konnte ein PCR-Produkt (249 bp) nachgewiesen werden. Marker = 100 bp, jeweils links aufgetragen.



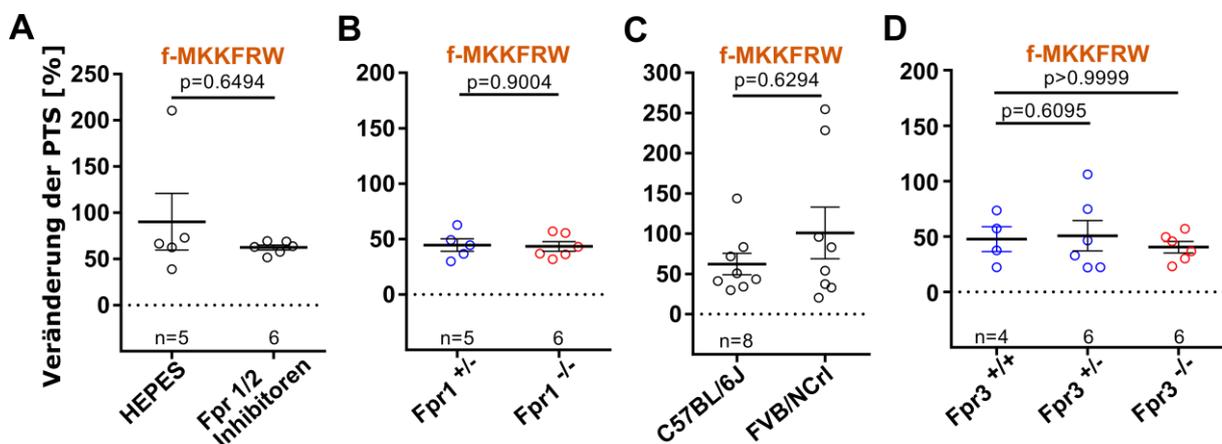
**Abbildung 59: Expression von Fpr in mittels FACS isolierten trachealen Epithelzellen der Maus. A-C:** RT-PCR-Experimente mit Proben aus Tracheen von *Trpm5*-eGFP-Mäusen. EpCAM-positive Zellen sind CD45 negativ. H<sub>2</sub>O = PCR-Ansatz ohne cDNA. **A:** PCR-Produkte mit *Primern* spezifisch für  $\beta$ -Aktin konnten in allen Proben mit Reverse Transkriptase nachgewiesen werden (RT+). **B:** PCR-Produkte mit *Primern* spezifisch für GFP konnte nur in isolierten Zellen nachgewiesen werden, welche in der Durchflusszytometrie als GFP-positiv identifiziert wurden (GFP+; EpCAM+, CD45 low). **C:** PCR-Produkte mit *Primern* spezifisch für die Fpr 1, 2, -rs1, -rs3, -rs4, -rs6 und -rs7 konnten nur in der Positivkontrolle, dem VNO, nachgewiesen werden. Marker = 100 bp, jeweils links aufgetragen. Modifiziert aus Perniss et al. 2020b.



**Abbildung 60: Expression des Fpr3 im VNO der Maus, aber nicht in der Trachea.** Repräsentative Hellfeldaufnahmen von der Nase (obere Reihe) und Trachea einer *Fpr3*-Ko-Maus (MOB = *main olfactory bulb*). Einzelne Zellen im VNO zeigen eine blaue Färbung (obere Reihe, rechte Aufnahmen). In der Trachea konnten keine blau gefärbten Zellen gefunden werden. Es wurden insgesamt vier *Fpr3*-Ko-Mäuse und drei Kontrolltiere (*Fpr3*-wildtyp) untersucht. In den Kontrolltieren konnten keine blau gefärbten Zellen beobachtet werden. Modifiziert aus Perniss et al. 2020b.

Wie in Abbildung 58 dargestellt konnte die Expression des Fpr1 und Fpr2 im Trachealepithel nachgewiesen werden. Jedoch zeigten die RT-PCR-Experimente an isolierten trachealen Epithelzellen welche in Abbildung 59 dargestellt sind, dass diese keine Fpr exprimieren. Die in Abbildung 58 dargestellte Fpr-Expression lässt sich vermutlich auf Immunzellen zurückführen, welche sich ebenfalls im Trachealepithel befinden und Fpr exprimieren (Migeotte et al. 2006). Da aber eine Beteiligung von Immunzellen oder anderen Zellen, welche Fpr exprimieren, nicht ausgeschlossen werden konnte, wurden anschließend PTS-Experimente mit Inhibitoren spezifisch für den Fpr1 (CyclosporinH, 1 µM) und Fpr2 (tBoc2, 10 µM) durchgeführt. Dabei zeigte sich kein Unterschied in der Steigerung der PTS nach Applikation von f-MKKFRW ( $p=0,6494$ ;  $n=5-6$ ; Mann-Whitney-U-Test) (Abb. 61A; Appendix Tab. 21). Zusätzlich wurden *Fpr1*-defiziente Mäuse getestet. Auch hier konnte kein Unterschied in der Steigerung der PTS nach Applikation von f-MKKFRW im Vergleich zum korrespondierendem Wildtyp festgestellt werden ( $p=0,9004$ ;  $n=5-6$ ; Mann-Whitney-U-Test) (Abb. 61B; Appendix Tab. 22). Obwohl eine Expression des Fpr3 in der Trachea nicht nachweisbar war, erfolgten Experimente an zwei Mausstämmen, welche keinen funktionellen

Fpr3 besitzen. Grund dafür ist, dass gezeigt werden konnte, dass das Peptid f-MKKFRW einen Agonisten für den Fpr3 darstellt (Bufe et al. 2019). In der Mauslinie FVB/NCrl liegt eine Mutation des Fpr3 vor, welche zu einem nicht funktionellen Rezeptor führt (Stempel et al. 2016). In dieser Mauslinie konnte kein Unterschied in der Steigerung der PTS durch f-MKKFRW im Vergleich zu C57BL/6J-Mäusen beobachtet werden ( $p=0,6294$ ;  $n=8$ ; Mann-Whitney-U-Test) (Abb. 61C; Appendix Tab. 23). Zusätzlich wurde der Mausstamm *Fpr3*-Ko getestet, in diesem Mausstamm liegt eine Deletion des *Fpr3* vor. Auch hier zeigte sich kein Unterschied zwischen den homozygoten Ko-Tieren und heterozygoten bzw. homozygoten Wt-Tieren in der Stimulation der PTS durch f-MKKFRW ( $p=0,6095$ ;  $p>0,9999$ ;  $n=4-6$ ; Mann-Whitney-U-Test) (Abb. 61D; Appendix Tab. 24).



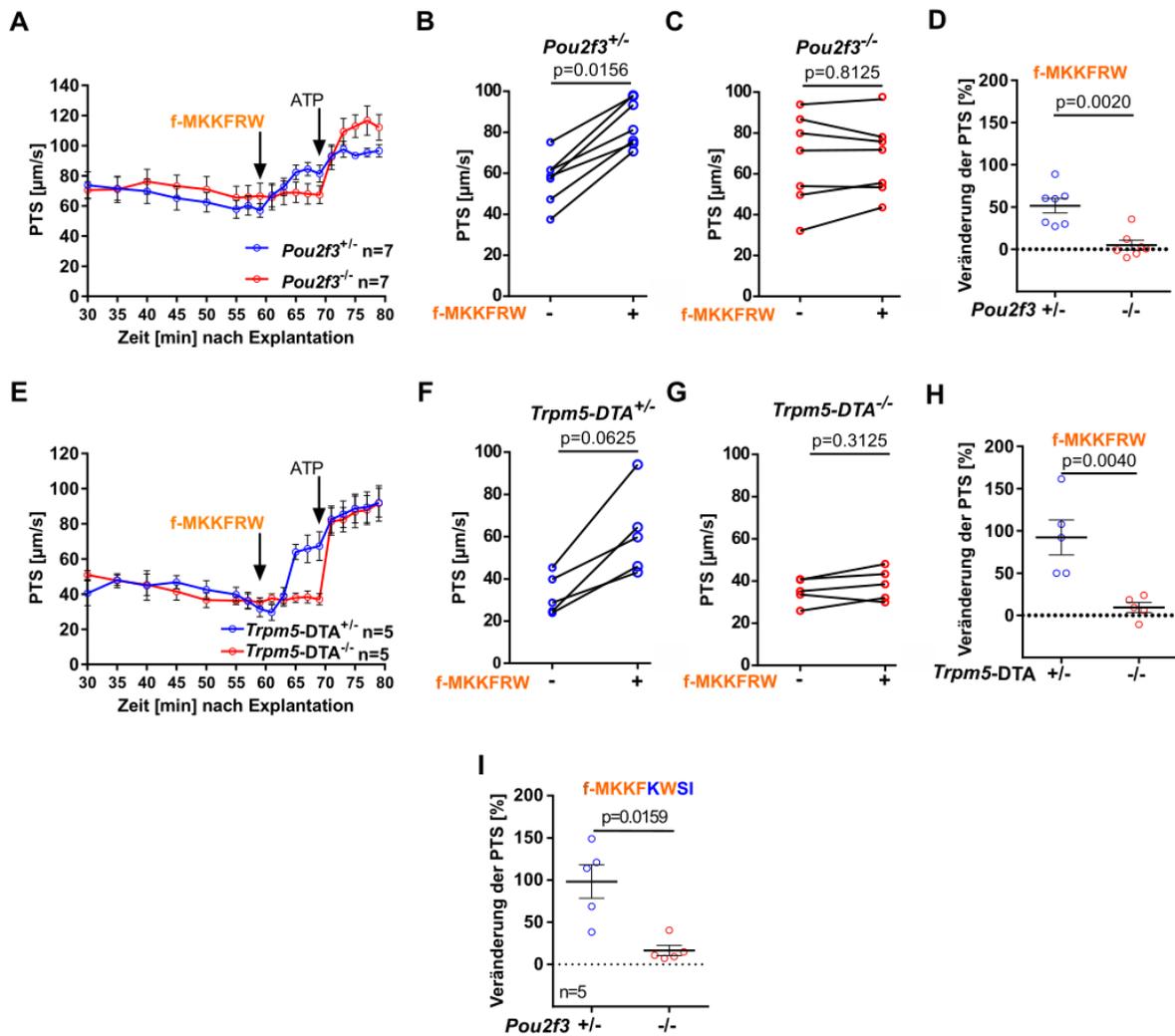
**Abbildung 61: Veränderung der PTS nach Applikation von f-MKKFRW in Abhängigkeit von Fpr.** A-D: Dargestellt ist die prozentuale Veränderung der PTS durch Applikation von f-MKKFRW (10  $\mu$ M) nach 8 min. **A:** Die Fpr1- und Fpr2-Inhibitoren (CyclosporinH 1  $\mu$ M und tBoc2 10  $\mu$ M) haben im Vergleich zur Applikation von HEPES keinen Einfluss auf die Steigerung der PTS durch f-MKKFRW. **B:** Bei der Steigerung der PTS durch f-MKKFRW an Tracheen von *Fpr1*-defizienten und heterozygoten Kontrolltieren ist kein Unterschied feststellbar. **C:** Die Mauslinie FVB/NCrl trägt eine Mutation im *Fpr3*-Gen, was zu einem nicht funktionellen Rezeptor führt. Ein Unterschied in der Steigerung der PTS durch f-MKKFRW konnte nicht beobachtet werden. **D:** Die Applikation von f-MKKFRW führt in *Fpr3*-defizienten Tieren sowie in heterozygoten und Wildtypen zum gleichen Anstieg der PTS. A-D: Mittelwert  $\pm$  SEM, Mann-Whitney-U-Test. Modifiziert aus Perniss et al. 2020b.

Aus diesen Versuchen lässt sich schlussfolgern, dass Fpr vermutlich nicht an der Beeinflussung der PTS durch das Signalpeptid f-MKKFRW beteiligt sind.

### 3.4.1.2 Beteiligung von SCCC und der Geschmackstransduktionskaskade an der Erhöhung der PTS durch bakterielle Signalpeptide

Solitäre cholinerge chemosensorische Zellen der oberen Atemwege (Nasenschleimhaut) können Bitterstoffe, z.B. Denatonium, und durch Bakterien produzierte Stoffe, z.B. *Quorum sensing*-Moleküle, wahrnehmen (Saunders et al. 2014). Aus diesem Grund wurde untersucht, ob SCCC der Trachea an der Erhöhung der PTS durch das formylierte Signalpeptid f-MKKFRW beteiligt sind. Hierzu wurden Mausstämme verwendet, bei denen entweder SCCC im ganzen ablatiert sind, oder Komponenten der klassischen Geschmackstransduktionskaskade deletiert wurden.

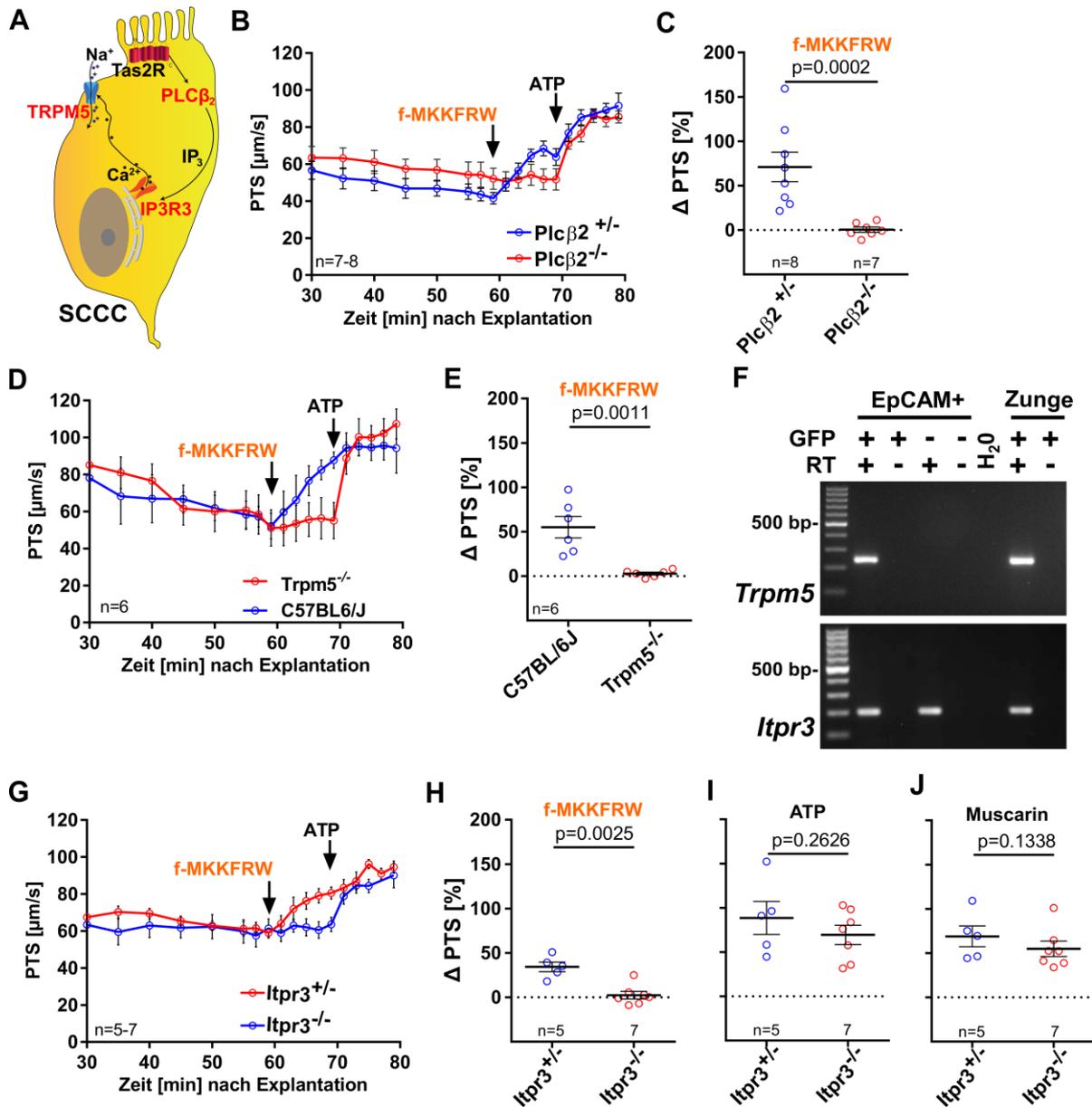
Es zeigte sich dabei, dass im Mausstamm *Pou2f3*-Ko, in dem keine SCCC vorhanden sind, die Applikation von f-MKKFRW zu keiner Erhöhung der PTS führte ( $p=0,8125$ ;  $n=7$ ). Dagegen war der Effekt im heterozygoten Kontrollstamm unverändert zu beobachten ( $p=0.0156$ ;  $n=7$ ) (Wilcoxon-Rangsummentest). Vergleicht man den prozentualen Anstieg der PTS, verursacht durch f-MKKFRW, so unterschied sich dieser ebenfalls zwischen homozygoten und heterozygoten Mäusen des Mausstammes *Pou2f3*-Ko (Reduktion um  $\sim 90\%$ ;  $p=0.002$ ;  $n=7$ ; Mann-Whitney-U-Test) (Abb. 62A-D; Appendix Tab. 25). In einem zweiten Mausmodell, in dem SCCC ablatiert sind, dem Mausstamm *Trpm5*-DTA, konnte ebenfalls beobachtet werden, dass die Applikation von f-MKKFRW zu einer geringeren Erhöhung der PTS im Vergleich zum Kontrollstamm führte (Reduktion um  $\sim 90\%$ ;  $p=0.0040$ ;  $n=5$ ; Mann-Whitney-U-Test) (Abb. 62E-H; Appendix Tab. 25). Als Kontrollstamm dienten *Trpm5*-IRES-CRE (Wt) verpaart mit R26:lacZbPAfloxDTA (*Trpm5*-DTA<sup>+/-</sup>). Jedoch ist zu beachten, dass in diesen Versuchen bei einer Gruppengröße von jeweils 5 Tieren unter Verwendung eines gepaarten Testverfahrens (Wilcoxon-Rangsummentest) an *Trpm5*-DTA<sup>+/-</sup>-Tieren die Applikation von f-MKKFRW nicht zu einem signifikanten Unterschied der PTS führte ( $n=5$ ;  $p=0,0625$ , Abb. 62C). So entsprach der gemittelte PTS-Wert vor Applikation in *Trpm5*-DTA<sup>+/-</sup>-Tieren  $32,5 \pm 0,6 \mu\text{m/s}$ , nach Applikation dagegen  $61,5 \pm 0,9 \mu\text{m/s}$ . In *Trpm5*-DTA<sup>-/-</sup>-Tieren entsprach der PTS-Wert vor Applikation  $35,2 \pm 0,5 \mu\text{m/s}$ , nach Applikation  $38,4 \pm 0,5 \mu\text{m/s}$  (Abb. 62F und G; Appendix Tab. 25). Dies entspricht einer Steigerung der PTS durch f-MKKFRW in *Trpm5*-DTA<sup>+/-</sup>-Tieren um  $\sim 29 \mu\text{m/s}$ , in *Trpm5*-DTA<sup>-/-</sup>-Tieren dagegen nur um  $\sim 3 \mu\text{m/s}$ . Zudem wurde das sequenzähnliche Signalpeptid f-MKKFKWSI ebenfalls im *Pou2f3*-Mausstamm getestet. Dabei konnte ebenso wie bei der Applikation von f-MKKFRW ein Unterschied zwischen heterozygoten und homozygoten Tieren in der Erhöhung der PTS beobachtet werden (Reduktion um  $\sim 83\%$ ;  $p=0.0159$ ;  $n=5$ ; Mann-Whitney-U-Test) (Abb. 62I).



**Abbildung 62: Veränderung der PTS nach Applikation von f-MKKFRW und f-MKKFKWSI in Abhängigkeit von SCCC. A-H:** Applikation von f-MKKFRW (10  $\mu\text{M}$ ) an Tracheen des Mausstammes *Pou2f3*-Ko (*Pou2f3*<sup>-/-</sup>) und heterozygoten Kontrolltieren (*Pou2f3*<sup>+/-</sup>) sowie des Mausstammes *Trpm5*-DTA (*Trpm5*-DTA<sup>-/-</sup>) und Kontrolltieren (*Trpm5*-DTA<sup>+/-</sup>). **A und E:** Dargestellt ist der Kurvenlauf der Experimente. **B, C, F, G:** Auswertung der Experimente dargestellt in A und E, PTS-Werte vor der Applikation von f-MMKFRW und 8 min nach Applikation. **B, C:** Die Applikation von f-MKKFRW führt zu einem signifikanten Anstieg der PTS ( $p=0,0156$ ) in *Pou2f3*<sup>+/-</sup>-Tieren. Dieser ist in Tracheen von *Pou2f3*<sup>-/-</sup> nicht zu beobachten ( $p=0,8125$ ). **F, G:** Die Applikation von f-MKKFRW führt zu keinem signifikanten Anstieg der PTS ( $p=0,0625$ ) in *Trpm5*-DTA<sup>+/-</sup>-Tieren, jedoch ist eine Tendenz zu einer Erhöhung der PTS zu erkennen. Ein Anstieg der PTS ist in Tracheen von *Trpm5*-DTA<sup>-/-</sup> jedoch nicht zu erkennen ( $p=0,3125$ ). **D, H, I:** Prozentuale Veränderung der PTS durch Applikation von f-MKKFRW (D, H) oder f-MKKFKWSI (I), jeweils 10  $\mu\text{M}$ . **D:** Der Anstieg der PTS ist in *Pou2f3*<sup>-/-</sup>-Tieren im Vergleich zu heterozygoten Kontrolltieren nahezu vollständig aufgehoben ( $p=0,0020$ ). **H:** Der Anstieg der PTS ist in *Trpm5*-DTA<sup>-/-</sup>-Tieren im Vergleich zu heterozygoten Kontrolltieren nahezu vollständig aufgehoben ( $p=0,0040$ ). **D:** Der Anstieg der PTS durch f-MKKFKWSI ist in *Pou2f3*<sup>-/-</sup>-Tieren im Vergleich zu heterozygoten Kontrolltieren nahezu vollständig aufgehoben ( $p=0,0159$ ). **A-I:** Mittelwert  $\pm$  SEM. **B, C, F, G:** Wilcoxon-Rangsummentest. **D, H, I:** Mann-Whitney-U-Test. **D, H, I:** Modifiziert aus Perniss et al. 2020b.

Darauffolgend wurde untersucht, ob Komponenten der klassischen Geschmackskaskade an der Erhöhung der PTS durch f-MKKFRW beteiligt sind (Abb. 63A). In Mäusen, in denen das Enzym PLC $\beta$ 2 deletiert ist, führte die Applikation von f-MKKFRW zu einer massiv verringerten Stimulation der PTS im Vergleich zu heterozygoten Kontrolltieren des gleichen Stammes (Reduktion um ~99%;  $p=0.0002$ ;  $n=7$ ) (Abb. 63B und C; Appendix Tab. 26). Ebenso konnte dies in dem Mausstamm *Trpm5*-Ko beobachtet werden, in dem der Kanal TRPM5 deletiert ist, hier dienten jedoch Tiere des Mausstammes C57BL/6j als Vergleichstiere (Reduktion um ~95%;  $p=0.0011$ ;  $n=6$ ) (Abb. 63D und E; Appendix Tab. 26). Die Expression der Proteine TRPM5 und PLC $\beta$ 2 ist im Epithel der Trachea von Mäusen auf SCCC beschränkt (Kaske et al. 2007; Krasteva et al. 2011). Dies konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit ebenso unter der Verwendung von immunhistochemischen Methoden validiert werden (Abb. 44B). Die Expression des Rezeptors IP3R3 (*Itpr3*) wurde jedoch noch nicht in trachealen SCCC der Maus nachgewiesen. Da ein geeigneter Antikörper für immunhistochemische Färbungen nicht zur Verfügung stand, wurde die Expression des Rezeptors mit Hilfe von RT-PCR-Experimenten an isolierten trachealen Epithelzellen durchgeführt. Hierzu wurden die gleichen Proben, wie in Abb. 59 bereits dargestellt, verwendet. Es zeigte sich dabei, dass *Trpm5*-mRNA nur in GFP-positiven Zellen zu finden war, *Itpr3*-mRNA konnte dagegen auch in GFP-negativen Epithelzellen nachgewiesen werden (Abb. 63F). In dem Mausstamm *Itpr3*-Ko, in dem der Rezeptor IP3R3 deletiert ist, konnte zugleich eine Reduktion des Effektes von f-MKKFRW beobachtet werden (Reduktion um ~93%;  $p=0.0025$ ;  $n=5$ ; Mann-Whitney-U-Test) (Abb. 63G und H; Appendix Tab. 26). Die Reaktion auf ATP sowie auf Muscarin blieb in dem Mausstamm *Itpr3*-Ko jedoch unverändert ( $p=0.2626$ ;  $p=0.1338$ ;  $n=5-7$ ; Mann-Whitney U-Test) (Abb. 63I und J; Appendix Tab. 27).

Aus diesen Versuchen lässt sich schlussfolgern, dass SCCC an der Erhöhung der PTS durch die Signalpeptide f-MKKFRW und f-MKKFKWSI beteiligt sind. Zudem sind die Komponenten der Geschmackstransduktionskaskade PLC $\beta$ 2 und TRPM5, welche ausschließlich in SCCC exprimiert sind, essentiell für die Erhöhung der PTS durch f-MKKFRW. Der Rezeptor IP3R3 ist ebenso essentiell, jedoch nicht ausschließlich in SCCC exprimiert, sondern auch in anderen Epithelzellen vorhanden.



**Abbildung 63: Veränderung der PTS nach Applikation von f-MKKFRW in Abhängigkeit von Komponenten der Geschmackstransduktionskaskade.** **A:** Schematische Zusammenfassung eines möglichen Signalweges in SCCC. **B:** Kurvenverlauf der Experimente an *Plcβ2*<sup>-/-</sup>-Tieren und heterozygoten Kontrolltieren. **C:** Auswertung der Experimente dargestellt in B, prozentuale Veränderung der PTS durch Applikation von f-MKKFRW (10 µM). Der Anstieg der PTS ist in *Plcβ2*<sup>-/-</sup>-Tieren verringert im Vergleich zu heterozygoten Kontrolltieren (p=0,0002; n=7-8). **D:** Kurvenverlauf der Experimente an *Trpm5*<sup>-/-</sup>-Tieren und C57BL6/J-Kontrolltieren. **E:** Auswertung der Experimente dargestellt in D, prozentuale Veränderung der PTS durch Applikation von f-MKKFRW (10 µM). Der Anstieg der PTS ist in *Trpm5*<sup>-/-</sup>-Tieren verringert im Vergleich zu C57BL6/J Kontrolltieren (p=0,0011; n=6). **F:** RT-PCR Experimente an isolierten trachealen Epithelzellen von *Trpm5*-GFP-Mäusen. Dargestellt sind PCR-Experimente mit den gleichen cDNA-Proben, welche in Abb. 12B bereits verwendet wurden. Transkripte der *Trpm5*-mRNA waren nur in GFP-positiven Epithelzellen zu finden. Dagegen waren Transkripte der *Itpr3*-mRNA in GFP-positiven und GFP-negativen Epithelzellen nachzuweisen. Marker = 100 bp, links aufgetragen. **G:** Kurvenverlauf der Experimente an *Itpr3*<sup>-/-</sup>-Tieren und heterozygoten Kontrolltieren. **H:** Auswertung der Experimente dargestellt in G, prozentuale Veränderung der PTS durch Applikation von f-MKKFRW (10 µM). Der Anstieg der PTS ist in *Itpr3*<sup>-/-</sup>-Tieren verringert im Vergleich zu

heterozygoten Kontrolltieren ( $p=0,0025$ ;  $n=7-8$ ). **I, J:** In der prozentualen Veränderung der PTS durch Applikation von ATP (100  $\mu\text{M}$ ) und Muskarin (10  $\mu\text{M}$ ) ist kein Unterschied zwischen *Itpr3*<sup>-/-</sup> und *Itpr3*<sup>+/-</sup>-Mäusen feststellbar ( $p=0,2626$ ;  $p=0,1338$ ;  $n=5-7$ ). **B-F:** Mittelwert  $\pm$  SEM. **C, E, H, I, J:** Zeitpunkt jeweils 8 min nach Applikation, Mann-Whitney-U-Test. **A, C, E, F, H-J:** Modifiziert aus Perniss et al. 2020b.

### 3.5 Einfluss von Geschmacksrezeptoren und ihren Liganden auf die PTS

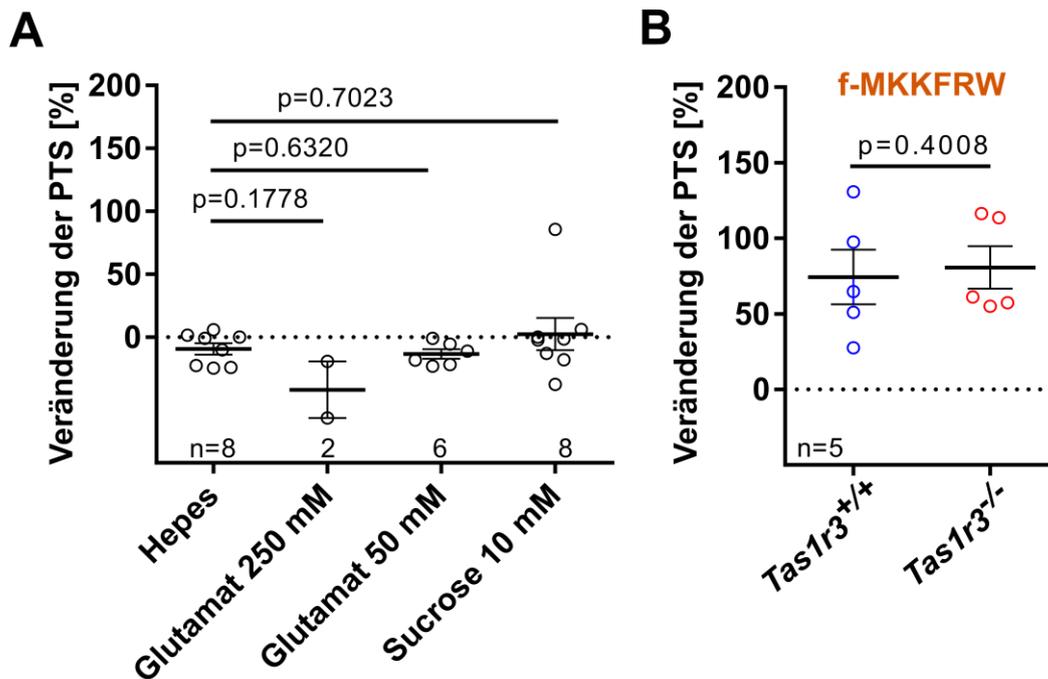
Die bisherigen Befunde weisen darauf hin, dass Komponenten der Geschmackstransduktionskaskade (TRPM5, PLC $\beta$ 2 und ITPR3) an der Erhöhung der PTS durch das Signalpeptid f-MKKFRW, vermittelt durch SCCC, beteiligt sind. Aus diesem Grund wurde im nachfolgenden Abschnitt die Beteiligung von Geschmacksrezeptoren an der Modulation der PTS durch f-MKKFRW untersucht, da diese am Anfang der Geschmackstransduktionskaskade stehen. Zusätzlich erfolgten Experimente mit Agonisten für Geschmacksrezeptoren, welche in Bürstenzellen nachgewiesen werden konnten, um zu untersuchen, ob diese einen Einfluss auf die PTS aufweisen, welcher durch SCCC vermittelt sein könnte.

#### 3.5.1 Beeinflussung der PTS in Abhängigkeit von Tas1r-Geschmacksrezeptoren

Unter der Verwendung von Mäusen, in denen der Geschmacksrezeptor Tas1r3 deletiert ist (*Tas1r3*-Ko), wurde untersucht, ob eine Beteiligung der heterodimeren Geschmacksrezeptoren, welche für die Erkennung der Geschmacksqualitäten umami und süß verantwortlich sind, an der Erhöhung der PTS durch f-MKKFRW vorliegt. Der Rezeptor Tas1r3 ist in trachealen SCCC exprimiert (Bankova et al. 2018; Nadjombati et al. 2018; Tizzano et al. 2011) und kann Heterodimere mit dem Rezeptor Tas1r1 ausbilden. Dies führt zu einem funktionellen Rezeptor, welcher Stoffe mit der Geschmacksqualität „umami“ registriert (Nelson et al. 2002). Ein typischer Agonist für diesen heterodimeren Rezeptor (Tas1r3-Tas1r1) ist Glutamat (Mononatriumglutamat) (Nelson et al. 2002). Die Applikation von Glutamat in zwei verschiedenen Konzentrationen (50 mM und 250 mM) führte jedoch zu keiner Veränderung der PTS ( $p=0,1778$ ;  $n=6$  und  $p=0,6320$ ;  $n=2$ ; Mann-Whitney U-Test) (Abb. 64A; Appendix Tab. 28). Der Rezeptor Tas1r3 kann ebenso Heterodimere mit dem Rezeptor Tas1r2 ausbilden. Diese Rezeptorkombination ist für die Wahrnehmung von Stoffen verantwortlich, welche die Geschmacksqualität „süß“ aufweisen (Nelson et al. 2001). Einen typischen Agonisten dieser Rezeptorkombination stellt Saccharose dar (Nelson et al. 2001). Die Applikation von Saccharose führte jedoch im Vergleich zu der *vehicle*-Kontrolle zu keiner Veränderung der PTS ( $p=0,7023$ ;  $n=8$ ; Mann-Whitney U-Test) (Abb. 64A; Appendix Tab. 28). Zudem wurde getestet, ob Geschmacksrezeptoren für die Geschmacksqualitäten „süß“ und „umami“ an der Erhöhung der PTS durch f-MKKFRW beteiligt sind. Dabei zeigte sich, dass kein Unterschied

in der Reaktion auf f-MKKFRW zwischen *Tas1r3*-defizienten Mäusen und korrespondierenden Kontrollen bestand ( $p=0,4008$ ,  $n=5$ ; Mann-Whitney U-Test) (Abb. 64B; Appendix Tab. 29).

Aus diesen Versuchen lässt sich schlussfolgern, dass Agonisten für die heterodimeren Rezeptoren, welche die Geschmacksqualitäten „süß“ und „umami“ wahrnehmen, keinen Einfluss auf die PTS in der Trachea der Maus aufweisen. Zudem sind diese Rezeptoren ebenfalls nicht an der Erhöhung der PTS durch f-MKKFRW beteiligt.



**Abbildung 64: Veränderung der PTS in Abhängigkeit der Geschmacksrezeptoren *Tas1r3*, *Tas1r1* und *Tas1r2*.** **A:** Prozentuale Veränderung der PTS durch Applikation von Glutamat (250 mM oder 50 mM) oder Saccharose (10 mM) im Vergleich zu der Applikation des gleichen Volumens an HEPES-Puffer. Die Applikation dieser Stoffe führt zu keinem Anstieg der PTS. **B:** Die Applikation von f-MKKFRW (10  $\mu$ M) ist unverändert in *Tas1r3*-defizienten Mäusen im Vergleich zu homozygoten Wildtypen ( $p=0.4008$ ;  $n=5$ ). **A-B:** Mittelwert  $\pm$  SEM, Mann-Whitney-U-Test. Modifiziert aus Perniss et al. 2020b.

### 3.5.2 Beeinflussung der PTS in Abhängigkeit von *Tas2r*

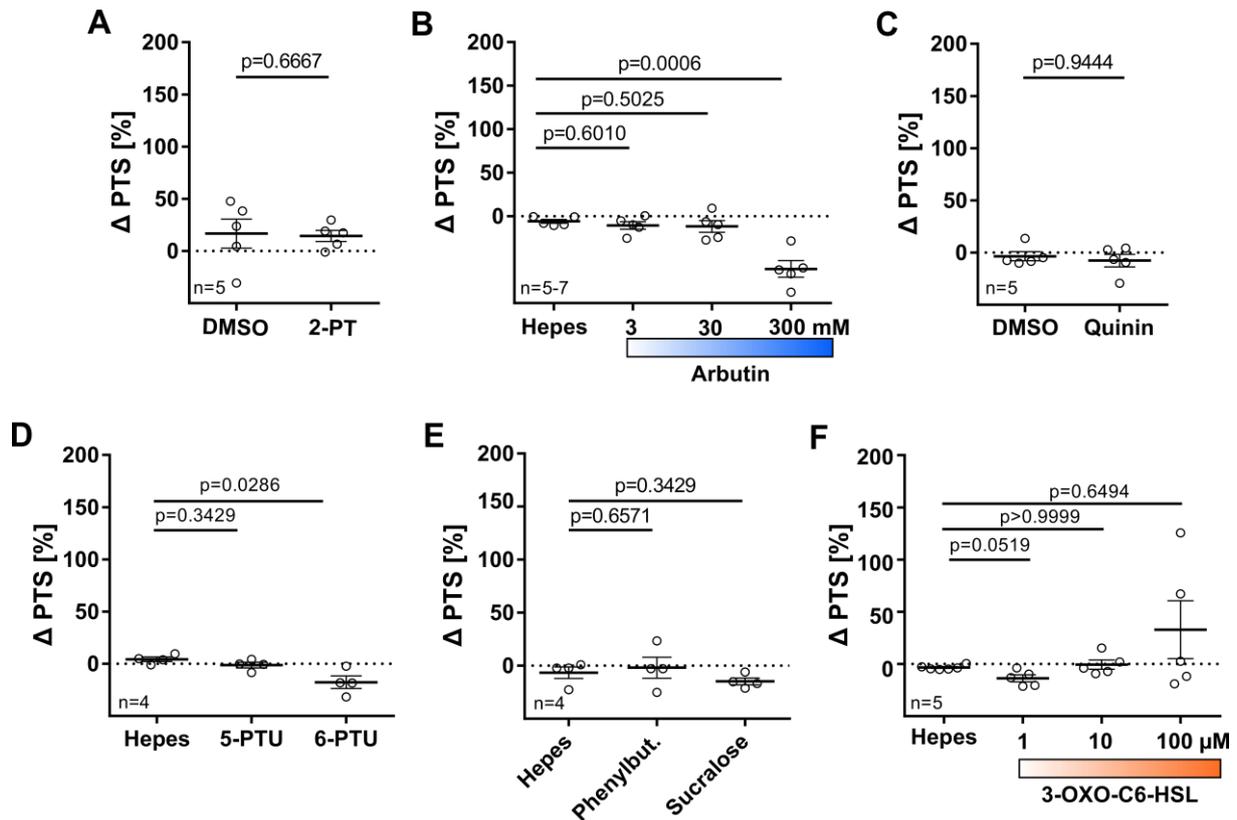
Tracheale SCCC der Maus exprimieren neben dem bereits beschriebenen Geschmacksrezeptor (*Tas1r3*) auch Geschmacksrezeptoren der Genfamilie *Tas2r*. Rezeptoren dieser Familie bilden, anders als die Rezeptoren der *Tas1r*-Familie, funktionale monomere Rezeptoren aus und sind für die Wahrnehmung von Stoffen, welche die Geschmacksqualität „bitter“ aufweisen, verantwortlich, sie werden daher als „Bitterrezeptoren“ bezeichnet (Meyerhof 2005). Es wird jedoch auch diskutiert, dass Rezeptoren dieser Familie funktionelle Oligomere ausbilden können, was zu einer Veränderung der Rezeptoraffinitäten führen könnte (Kuhn et al. 2010). Die *Tas2r*-Genfamilie

besteht bei der Maus aus 35 verschiedenen Rezeptoren. Davon konnten 18 Tas2r (Tas2r102, 104, 105, 106, 108, 113, 115, 116, 117, 118, 126, 129, 131, 135, 136, 137, 138, 143) in trachealen SCCC der Maus nachgewiesen werden (Bankova et al. 2018; Krasteva et al. 2011; Liu et al. 2017; Nadsjombati et al. 2018; Montoro et al. 2018). Acht (Tas2r102, 104, 106, 116, 118, 129, 131, 136) der 18 exprimierten Tas2r sind sogenannte "*orphan receptors*". Dies bedeutet, dass keine Liganden bzw. Agonisten für diese Rezeptoren bekannt sind (Lossow et al. 2016; Dagan-Wiener et al. 2019).

### 3.5.2.1 Tas2r-Agonisten

In den folgenden Versuchen wurden 12 verschiedene Bitterstoffe getestet. Diese stellen Agonisten für die 10 in trachealen SCCC exprimierten Bitterrezeptoren dar, für die Agonisten bekannt sind. Die verwendeten Agonisten wurden in den Konzentrationen appliziert, die in transfizierten Zellen, welche verschiedene murine Bitterrezeptoren exprimieren, zu  $Ca^{2+}$ -Signalen führten. Hierbei kann die Arbeit von Lossow und KollegInnen als Grundlage der verwendeten Konzentrationen angesehen werden (Lossow et al. 2016). Der Bitterstoff 2-Propylthietan (2-PT) stellt einen Agonisten für den Rezeptor Tas2r143 dar (Moine et al. 2018). Die Applikation von 2-PT (1 mM) führte zu keiner Änderung der PTS im Vergleich zu der Applikation des Lösungsmittels DMSO ( $p=0,6667$ ;  $n=5$ , Mann-Whitney-U-Test) (Abb. 65A; Appendix Tab. 30). Die Substanz Arbutin stellt einen Agonisten für den Rezeptor Tas2r126 dar (Lossow et al. 2016). Die Applikation von Arbutin (3 und 30 mM) führte zu keiner Änderung der PTS im Vergleich zu der Applikation des Lösungsmittels DMSO ( $p=0,6010$ ;  $p=0,5025$ ;  $n=5$ , Mann-Whitney-U-Test) (Abb. 65B; Appendix Tab. 33). Die Applikation von 300 mM Arbutin dagegen verringerte die PTS ( $p=0,0006$ ;  $n=5$ , Mann-Whitney U-Test). (Abb. 65B). Die Substanz Quinin ist ein Agonist für die Bitterrezeptoren Tas2r105, 108, 115, 126, 137, 140 und 144 (Lossow et al. 2016). Die PTS wurde jedoch durch Quinin (0,01 mM) nicht verändert ( $p=0,9444$ ;  $n=5$ ; Mann-Whitney-U-Test) (Abb. 65C; Appendix Tab. 30). Die Substanz 5-Propyl-2-thiouracil (5-PTU) ist ein Agonist für die Bitterrezeptoren Tas2r121, 135, 137, 138, 140 und 144 (Lossow et al. 2016). Die Applikation von 5-PTU (1 mM) führte zu keiner Veränderung der PTS ( $p=0,3429$ ;  $n=4$ ; Mann-Whitney U-Test) (Abb. 65D; Appendix Tab. 32). Die Substanz 6-Propyl-2-thiouracil (6-PTU) ist ein Agonist für die Bitterrezeptoren Tas2r105, 108, 120, 121, und 123 (Lossow et al. 2016). Deren Applikation (1 mM) führte zu einer Reduktion der PTS ( $p=0,0286$ ;  $n=4$ ; Mann-Whitney U-Test) (Abb. 65D; Appendix Tab. 32). Die Substanz Phenylbutazon ist ein Agonist für die Bitterrezeptoren Tas2r105 und 113 (Lossow et al. 2016). Ihre Applikation (0,001 mM) führte zu keiner Veränderung der PTS ( $p=0,6571$ ;  $n=4$ ; Mann-Whitney U-Test) (Abb. 65E; Appendix Tab. 31). Die Substanz Sucralose stellt einen Agonisten für die Bitterrezeptoren Tas2r105, 109, 115, 117, 123, 139 und 144 dar (Lossow et al. 2016). Die Applikation (3 mM) führte jedoch zu keiner Veränderung der PTS ( $p=0,3429$ ;  $n=4$ ; Mann-

Whitney U-Test) (Abb. 65E; Appendix Tab. 31). Das Homoserin-Lacton N-(3-Oxohexanoyl)-L (3-Oxo-C6-HSL) stellt einen Agonisten für den Bitterrezeptor Tas2r105 dar (Lossow et al. 2016). Zudem wurde gezeigt, dass dieses Homoserin-Lacton  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale in TRPM5<sup>+</sup> chemosensorischen Epithelzellen der Nase von Mäusen hervorruft (Tizzano et al. 2010). Die Applikation (0,001; 0,01; 0,1 mM) führte jedoch zu keiner Änderung der PTS ( $p=0,0519$ ;  $p>0,9999$ ; 0,6494;  $n=5$ ; Mann-Whitney U-Test) (Abb. 65F; Appendix Tab. 34).



**Abbildung 65: Einfluss von Bitterstoffen auf die PTS; Teil 1.** A-F: Prozentuale Veränderung der PTS 8 min nach Applikation der jeweiligen Substanzen. **A:** Die PTS nach Applikation des gleichen Volumens an DMSO unterscheidet sich nicht von der nach Applikation von 2-PT (2-Propylthietan; 1 mM) ( $p=0,6667$ ;  $n=5$ ). **B:** Die Applikation von Arbutin in den Konzentrationen 3 und 30 mM verändert die PTS nicht ( $p=0,6010$ ;  $p=0,5025$ ;  $n=5$ ). Die Applikation von 300 mM verringert die PTS ( $p=0,0006$ ;  $n=5$ ). **C:** Die Applikation von Quinin (0,01 mM) verändert die PTS nicht ( $p=0,9444$ ;  $n=5$ ). **D:** Die Applikation von 5-PTU (5-Propyl-2-thiouracil; 1 mM) und 6-PTU (6-Propyl-2-thiouracil; 1 mM) verändert die PTS nicht ( $p=0,3429$ ;  $p=0,0286$ ;  $n=5$ ). **E:** Die Applikation von Phenylbutazon (0,001 mM) und Sucralose (3 mM) verändert die PTS nicht ( $p=0,6571$ ;  $p=0,3429$ ;  $n=5$ ). **F:** Die Applikation von N-(3-Oxohexanoyl)-L (3-Oxo-C6-HSL; 1, 10 und 100  $\mu\text{M}$ ) verändert die PTS nicht ( $p=0,0519$ ;  $p>0,9999$ ;  $p=0,6494$ ;  $n=5$ ). **A-F:** Mittelwert  $\pm$  SEM, Mann-Whitney-U-Test. Modifiziert aus Perniss et al. 2020b.

Die folgenden vier Substanzen führten zu einer Erhöhung der PTS. Zum einen der Bitterstoff CHX, welcher einen Agonisten für den Bitterrezeptor Tas2r105 darstellt (Lossow et al. 2016). Die Applikation von CHX (0,1 mM) führte in C57Bl6/J-Mäusen zu einer Erhöhung der PTS von  $33 \pm 1$  auf  $37 \pm 1 \mu\text{s}$ . Dies entspricht einem Anstieg um  $12 \pm 2\%$ . Die Applikation des gleichen Volumens an Puffer führte dagegen zu einer Verringerung der PTS von  $38 \pm 1$  auf  $36 \pm 2$ . Dies

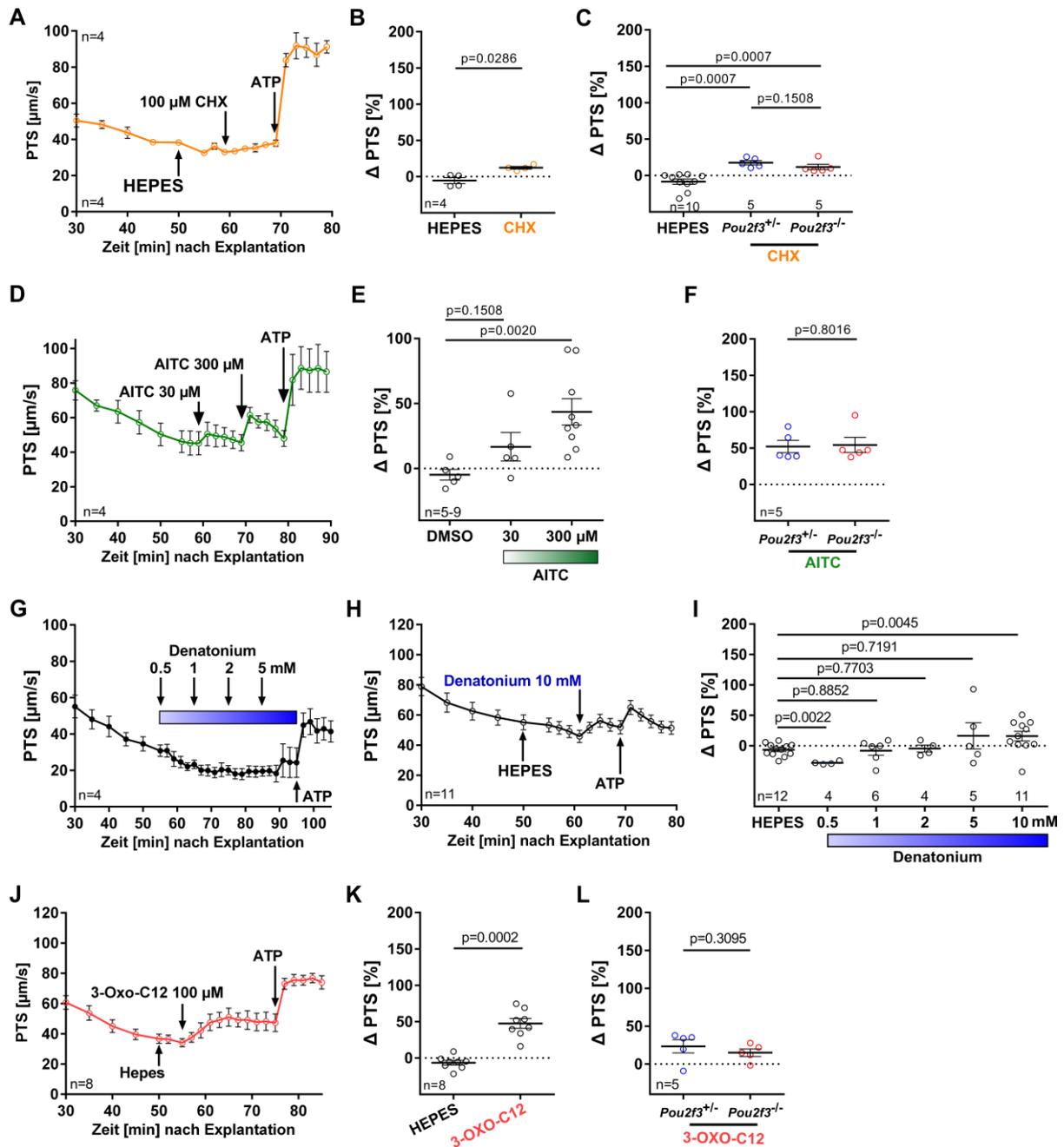
entspricht einer Änderung von  $5 \pm 4\%$ . Vergleicht man die Applikation des *vehicles* (Puffer) mit der von CHX, so unterscheiden diese sich ( $p=0,0286$ ;  $n=4$ ; Mann-Whitney U-Test) (Abb. 66A und B; Appendix Tab. 35). Diese vergleichsweise geringe Veränderung der PTS war ebenso in SCCC-defizienten Mäusen (*Pou2f3*-Ko) zu beobachten und war nicht verringert im Vergleich zu heterozygoten Kontrolltieren ( $p=0,1508$ ;  $n=5$ ; Mann-Whitney U-Test) (Abb. 66C; Appendix Tab. 35).

Zum anderen führte auch die Substanz Allylthiocyanat (AITC), welche einen Agonisten für den Rezeptor Tas2r135 darstellt (Lossow et al. 2016), ab höheren Konzentrationen zu einer Erhöhung der PTS. Die Applikation von  $30 \mu\text{M}$  AITC führte zu keiner Änderung der PTS ( $p=0,1508$ ;  $n=5$ ; Mann-Whitney U-Test), dagegen erhöhte die Gabe von  $300 \mu\text{M}$  AITC die PTS von  $50 \pm 3$  auf  $71 \pm 5 \mu\text{m/s}$  im Vergleich zu der Applikation des gleichen Volumens an DMSO ( $p=0,0020$ ;  $n=9$ ; Mann-Whitney U-Test). Dies entspricht einer Erhöhung um  $44 \pm 10\%$  (Abb. 66D und E; Appendix Tab. 36). Unter Verwendung von SCCC-defizienten Mäusen (*Pou2f3*-Ko) konnte kein Unterschied in der Erhöhung der PTS durch  $300 \mu\text{M}$  AITC im Vergleich zu den korrespondierenden heterozygoten Tieren festgestellt werden ( $p=0,8016$ ;  $n=5$ ; Mann-Whitney U-Test) (Abb. 66F; Appendix Tab. 36).

Die Substanz Denatoniumbenzoat ist ein Agonist der Bitterrezeptoren Tas2r105, 123, 135, 140 und 144 (Lossow et al. 2016). Die Applikation von 1, 2 und 5 mM veränderte die PTS im Vergleich zu der Applikation des gleichen Volumens an Hepes-Puffer nicht ( $p=0,8852$ ;  $p=0,7703$ ;  $p=0,7191$ ;  $n=6$ ;  $n=4$ ,  $n=5$ ; Mann-Whitney U-Test). Die Applikation von 0,5 mM Denatonium verringerte die PTS um  $28 \pm 1\%$  ( $p=0,0022$ ;  $n=4$ ; Mann-Whitney U-Test). Dagegen führte die Applikation von 10 mM zu einer Erhöhung der PTS um  $16 \pm 8\%$  ( $p=0,0045$ ;  $n=11$ ; Mann-Whitney U-Test), jedoch konnte nach Applikation von 10 mM Denatonium nur noch eine verminderte Stimulation der PTS durch ATP erreicht werden (Abb. 66G-I; Appendix Tab. 37).

Das QSM 3-Oxo-C12-HSL wird unter anderem von *Pseudomonas aeruginosa* sezerniert und ist essentiell für die Ausbildung eines Biofilms und die Expression von Virulenzfaktoren während einer Infektion (van Delden und Iglewski 1998). Zudem konnte gezeigt werden, dass diese Substanz einen Agonisten für den Bitterrezeptor Tas2r105 darstellt (Zheng et al. 2019). Die Applikation von  $100 \mu\text{M}$  3-Oxo-C12-HSL führte zu einem Anstieg der PTS von  $35 \pm 3$  auf  $52 \pm 5 \mu\text{m/s}$ . Dies entspricht einer Erhöhung um  $48 \pm 7\%$ , was sich von der Applikation des gleichen Volumens an HEPES-Puffer unterscheidet ( $p=0,0002$ ;  $n=8$ ; Mann-Whitney U-Test) (Abb. 66J und K; Appendix Tab. 38). In Tracheen von SCCC-defizienten Mäusen konnte ebenfalls ein Anstieg der PTS durch 3-Oxo-C12-HSL beobachtet werden, welcher sich nicht von dem in heterozygoten Kontrollen unterschied ( $p=0,3095$ ;  $n=5$ ; Mann-Whitney U-Test) (Abb. 66L; Appendix Tab. 38).

Fasst man diese Ergebnisse zusammen, so kann festgestellt werden, dass für jeden Bitterrezeptor, welcher in trachealen SCCC nachgewiesen wurde, mindestens ein bekannter Agonist verwendet wurde. Zusätzlich deckten die verwendeten Agonisten sieben weitere Bitterrezeptoren ab, welche nicht in SCCC exprimiert sind (Tas2r109, Tasr120, Tas2r121, Tas2r123, Tasr139, Tas2r140 und Tas2r144). Von den 12 verwendeten Agonisten führten 8 zu keiner Erhöhung der PTS. Dagegen resultierte die Applikation von vier Agonisten in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentration in einer Steigerung der PTS (CHX, Allylisothiocyanat, Denatonium und 3-Oxo-C12-HSL). Eine mögliche Beteiligung von SCCC an der Erhöhung der PTS durch diese Agonisten konnte in 3 Fällen (CHX, Allylisothiocyanat und 3-Oxo-C12-HSL) durch die Verwendung von SCCC-defizienten Mäusen ausgeschlossen werden. Die Applikation von Denatonium resultierte zwar in einer Erhöhung der PTS, jedoch war die nachfolgende Applikation der Lebendkontrolle ATP stark verändert im Vergleich zu Kontrollexperimenten.



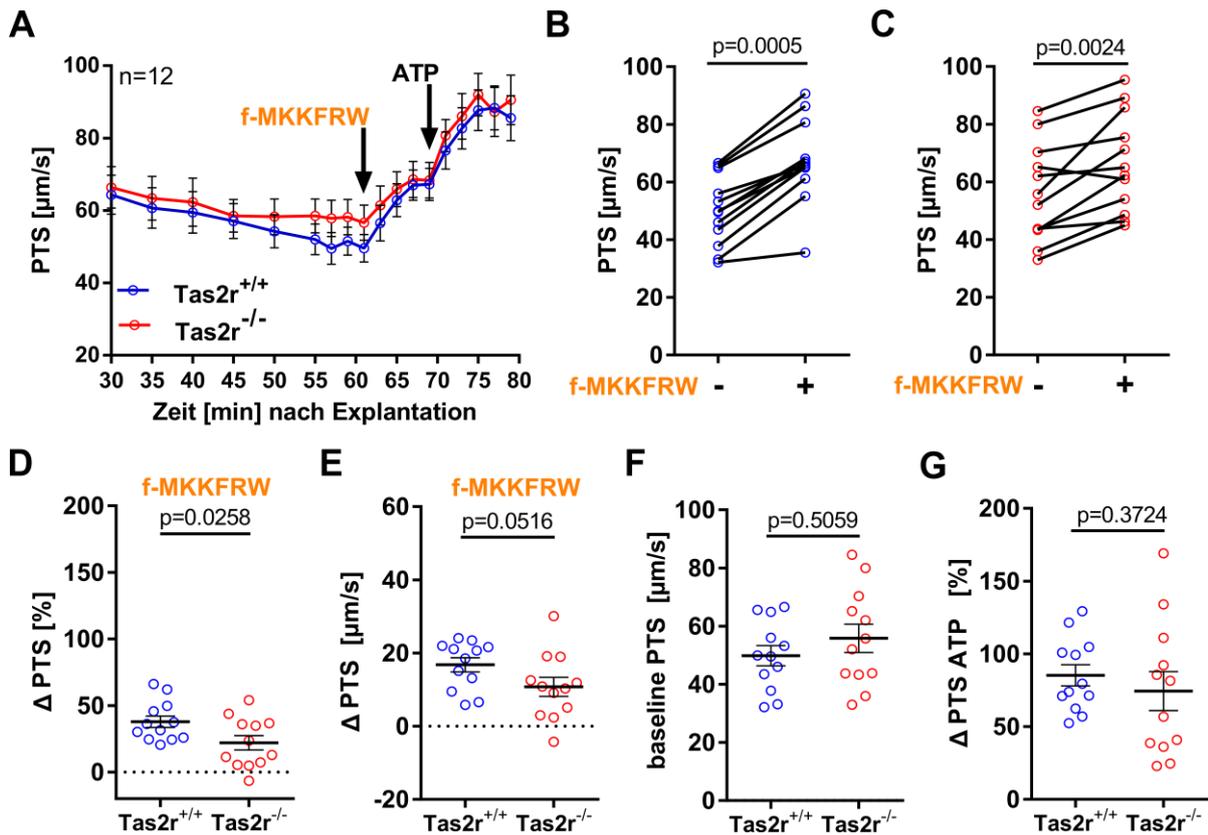
**Abbildung 66: Einfluss von Bitterstoffen auf die PTS und Abhängigkeit von SCC; Teil 2.** **A:** Applikation von CHX 100 µM, Kurvenverlauf der Experimente. **B:** Auswertung der in A dargestellten Experimente. CHX führte zu einem Anstieg der PTS im Vergleich zu der Applikation von HEPES ( $p=0,0286$ ;  $n=4$ ). **C:** Die Veränderung der PTS durch CHX unterscheidet sich nicht signifikant in Pou2f3<sup>+/-</sup>- und Pou2f3<sup>-/-</sup>-Mäusen ( $p=0,1508$ ;  $n=5$ ). **D:** Applikation von Allylisothiocyanat 30 µM und 300 µM (AITC), Kurvenverlauf der Experimente. **E:** Auswertung der in D dargestellten Experimente und zusätzlich durchgeführter Experimente. Die Applikation von 30 µM AITC verändert die PTS nicht signifikant ( $p=0,1508$ ;  $n=5$ ). Die Applikation von 300 µM AITC führt zu einem Anstieg der PTS ( $p=0,0020$ ;  $n=9$ ). **F:** Die Veränderung der PTS durch 300 µM AITC unterscheidet sich nicht in Pou2f3<sup>+/-</sup>- und Pou2f3<sup>-/-</sup>-Mäusen ( $p=0,8016$ ;  $n=5$ ). **G** und **H:** Applikation von Denatonium 0,5, 1, 2 und 5 mM (**G**,  $n=4$ ) und 10 mM (**H**;  $n=11$ ), Kurvenverlauf der Experimente. **I:** Auswertung der in G und H dargestellten Experimente und zusätzlich durchgeführter Experimente. Die Applikation von 0,5 mM µM Denatonium verringert die PTS ( $p=0,0022$ ;  $n=4$ ). Die Applikation von 1, 2, und 5 mM Denatonium verändert die PTS nicht ( $p=0,8852$ ;  $p=0,7703$ ;  $p=0,7191$ ;  $n=6$ ;  $n=4$ ;  $n=5$ ). Die

Applikation von 10 mM Denatonium führt zu einer Erhöhung der PTS ( $p=0,0045$ ;  $n=11$ ). **J**: Applikation von 3-OXO-C12-HSL (3-OXO-C12) 100  $\mu\text{M}$ , Kurvenverlauf der Experimente. **K**: Auswertung der in J dargestellten Experimente. 3-OXO-C12 führt zu einem Anstieg der PTS im Vergleich zu der Applikation von HEPES ( $p=0,0002$ ;  $n=8$ ). **L**: Die Veränderung der PTS durch 3-OXO-C12 unterscheidet sich nicht in *Pou2f3<sup>+/-</sup>*- und *Pou2f3<sup>-/-</sup>*-Mäusen ( $p=0,3095$ ;  $n=5$ ). **A-L**: Mittelwert  $\pm$  SEM. **B, C, E, F, I, K und L**: Wert 8 min nach Applikation, Mann-Whitney-U-Test. **A-C, E, F, I, K**: Modifiziert aus Perniss et al. 2020b.

### 3.5.2.2 Beeinflussung der PTS durch f-MKKFRW in Abhängigkeit von den Bitterrezeptoren

*Tas2r143/135/126*.

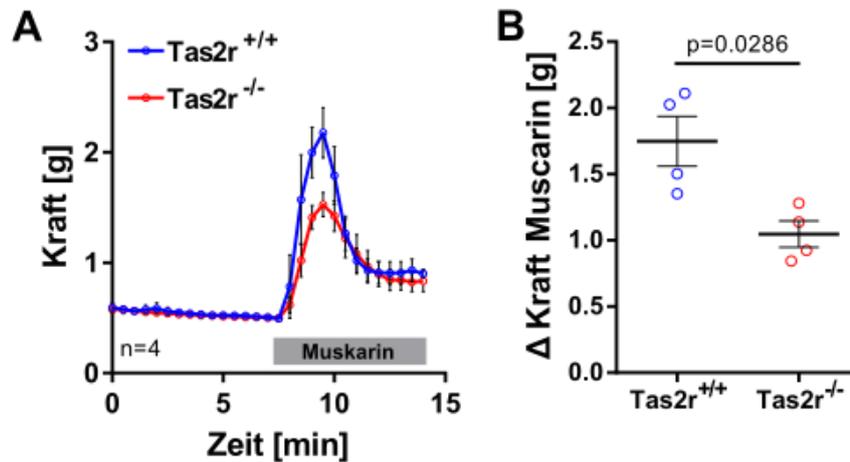
Die Bitterrezeptoren *Tas2r126* und *Tas2r135*, welche in trachealen SCCC exprimiert sind (Bankova et al. 2018; Krasteva et al. 2011; Montoro et al. 2018; Nadsombati et al. 2018; Liu et al. 2017), sind zusammen mit dem Rezeptor *Tas2r143* als Gen-Cluster auf dem Chromosom 6 von Mäusen lokalisiert (*Tas2r143*, *Tas2r135*, *Tas2r126*). Der Bitterrezeptor *Tas2r143* konnte dagegen nicht in Bürstenzellen nachgewiesen werden (Liu et al. 2017). Unter Verwendung von Reportertermäusen, in denen Zellen, welche Rezeptoren dieses Gen-Clusters und damit einhergehend das fluoreszierende Protein mCherry exprimieren, wurde gezeigt, dass ~87% der SCCC mCherry-positiv sind (Abschnitt 3.2.1.3). Zudem führten die Agonisten für den Rezeptor *Tas2r135* (AITC und Denatonium benzoat) zu einem Anstieg der PTS (Abb. 66D und H). Die Expression dieser Rezeptoren in einem hohen Prozentsatz der SCCC und die PTS-steigernde Wirkung der Agonisten lässt die Vermutung zu, dass die PTS-steigernde Wirkung des Signalpeptids f-MKKFRW im Zusammenhang mit diesen Bitterrezeptoren stehen könnte. Um dies zu untersuchen, wurden Mäuse, in denen dieses Gen-Cluster deletiert wurde (*Tas2r-Ko*, Abschnitt 3.2.2.4), verwendet. Dabei zeigte sich, dass die Applikation von f-MKKFRW sowohl in homozygoten Wt- als auch in Ko-Tieren zu einer Erhöhung der PTS führte (Abb. 67A). So stieg die PTS in korrespondierenden Wt-Tieren von  $49,9 \pm 3,5$  auf  $67,5 \pm 4 \mu\text{m/s}$  innerhalb von 8 min nach Applikation von f-MKKFRW an. Dies entspricht einer Erhöhung um  $37,9 \pm 4,4\%$  ( $p=0,0005$ ;  $n=12$ ; Wilcoxon-Rangsummentest) (Abb. 67B und D; Appendix Tab. 39). In homozygoten Ko-Tieren führte die Applikation von f-MKKFRW zu einer Erhöhung der PTS von  $55,8 \pm 4,9$  auf  $66,6 \pm 4,9 \mu\text{m/s}$ . Dies entspricht einer Erhöhung um  $22 \pm 5,4\%$  ( $p=0,0024$ ; Wilcoxon-Rangsummentest) (Abb. 67C und D). Vergleicht man den Anstieg der PTS in  $\mu\text{m/s}$  durch f-MKKFRW zwischen Wt- und Ko-Tieren, so besteht kein signifikanter Unterschied (Abb. 67E) ( $p=0,0516$ , Mann-Whitney-U-Test). Vergleicht man jedoch den prozentualen Anstieg der PTS, so ist dieser unterschiedlich (Abb. 67D) ( $p=0,0258$ , Mann-Whitney-U-Test). Der PTS-Wert vor Peptid-Gabe sowie die Reaktion auf ATP unterschieden sich zwischen Ko-Tieren und Wt-Tieren nicht ( $p=0,509$  und  $p=0,3724$ , Mann-Whitney-U-Test) (Abb. 67F und G).



**Abbildung 67: Veränderung der PTS durch f-MKKFRW in Abhängigkeit der Geschmacksrezeptoren Tas2r143,135,126.** **A:** Dargestellt ist der Kurvenlauf von jeweils 12 Experimenten in  $Tas2r^{143,135,126}$  defizienten Mäusen ( $Tas2r^{-/-}$ ) und korrespondierenden Wt-Kontrollen ( $Tas2r^{+/+}$ ). **B-G:** Auswertung der in A abgebildeten Experimente. **B und C:** PTS-Werte vor Applikation von f-MKKFRW und 8 min nach Applikation. In beiden Mausstämmen führt die Gabe von f-MKKFRW zu einem Anstieg der PTS (B:  $Tas2r^{+/+}$ ,  $p=0,0005$ ; C:  $Tas2r^{-/-}$ ,  $p=0,0024$ ). **D:** Der prozentuale Anstieg der PTS 8 min nach f-MKKFRW-Applikation ist in  $Tas2r^{-/-}$ -Tieren im Vergleich zu den Wt-Kontrolltieren verringert ( $p=0,0258$ ). **E:** Der Anstieg der PTS in  $\mu\text{m/s}$  8 min nach f-MKKFRW-Applikation ist in  $Tas2r^{-/-}$ -Tieren im Vergleich zu den Wt-Kontrolltieren nicht verringert ( $p=0,0516$ ). **F:** Die PTS-Werte vor der Applikation von f-MKKFRW ( $\text{baseline} = 59$  min) unterscheiden sich nicht zwischen  $Tas2r^{+/+}$ - und  $Tas2r^{-/-}$ -Tieren ( $p=0.5059$ ). **G:** Der prozentuale Anstieg der PTS 8 min nach ATP-Applikation ist in  $Tas2r^{-/-}$ -Tieren im Vergleich zu den Wt-Kontrolltieren nicht verringert ( $p=0,3724$ ). **B und C:** Wilcoxon-Rangsummentest. **D-G:** Mittelwert  $\pm$  SEM, Mann-Whitney-U-Test. **D:** Modifiziert aus Perniss et al. 2020b.

Um die beobachtete partielle Reduktion der PTS-Erhöhung durch f-MKKFRW in diesem Mausstamm genauer zu untersuchen, wurden Organbadversuche von Maryam Keshavarz (Institut für Anatomie und Zellbiologie, Gießen) an isolierten Harnblasen durchgeführt. Als Stimulus diente hier der muskarinische Acetylcholinrezeptor-Agonist Muskarin. Die Applikation von Muskarin resultierte in einer Kontraktion der Harnblase. Diese ist über die Bindung von Muskarin an den muskarinischen Rezeptor 3 vermittelt, welcher von glatten Muskelzellen in der Harnblase exprimiert wird (Stengel et al. 2002; Matsui et al. 2002). Bitterrezeptoren sind an dieser muskarin-induzierten Kontraktion nicht beteiligt. Die Applikation von Muskarin führte

in der Harnblase von *Tasr2143/135/126*-defizienten Mäusen und korrespondierenden Kontrollen zu einer Kontraktion der Harnblase (Abb. 68A und B). Diese war jedoch in den Ko-Tieren um 31% verringert im Vergleich zu den korrespondierenden Wt-Tieren (Abb. 68B) ( $p=0,0286$ ;  $n=4$ ; Mann-Whitney-U-Test).



**Abbildung 68: Kontraktionsmessungen an explantierten Harnblasen in Abhängigkeit der Geschmacksrezeptoren *Tas2r143,135,126*.** **A:** Dargestellt ist der Kurvenlauf von jeweils 4 Experimenten in *Tas2r143*-, *135*- und *126*-defizienten Mäusen (*Tas2r*<sup>-/-</sup>) und korrespondierenden Wt-Kontrollen (*Tas2r*<sup>+/+</sup>), Muskarin (10  $\mu$ M) wurde 7 min nach Beginn der Messung appliziert. **B:** Auswertung der in A gezeigten Experimente, bestimmt wurde die maximale Veränderung der gemessenen Zugkraft einer Harnblase in Reaktion auf die Applikation von Muskarin. Diese unterscheidet sich in Ko-Tieren im Vergleich zu homozygoten Wt-Tieren ( $p=0,0286$ ). **A-B:** Mittelwert  $\pm$  SEM. **B:** Mann-Whitney-U-Test. **A:** Modifiziert aus Perniss et al. 2020b.

Aus diesen Versuchen lässt sich schlussfolgern, dass die Geschmacksrezeptoren *Tas2r143, 135* und *126* vermutlich nicht an der Erhöhung der PTS durch f-MKKFRW beteiligt sind. Im Vergleich zu den korrespondierenden Wt-Tieren lag eine Reduktion der f-MKKFRW-induzierten Erhöhung der PTS um circa 40,6% in *Tas2r*-Ko-Tieren vor. Eine cholinerg vermittelte Kontraktion der Harnblase war in diesen Tieren ebenso um 31% vermindert. Dies deutet auf bitterrezeptorunabhängige Effekte in diesem Mausmodell hin.

### 3.6 Freisetzung von ACh durch tracheale SCCC

Die bisherigen Befunde weisen darauf hin, dass die Applikation von f-MKKFRW zu einer SCCC-abhängigen Erhöhung der PTS führt. Dies lässt vermuten, dass eine Kommunikation zwischen SCCC und zilienträgenden Zellen vorliegt. Aus diesem Grund wurde im nächsten Abschnitt untersucht, welches Signalmolekül bzw. welcher Signalweg an dieser Kommunikation beteiligt sein könnte. Einen starken Aktivator der PTS stellt ACh dar (Klein et al. 2009). Tracheale SCCC exprimieren zudem das ACh produzierende Enzym ChAT (Bankova et al. 2018; Krasteva et al. 2011) (Abschnitt 3.2.1.1). Im nachfolgenden wurde daher untersucht, ob die Applikation von f-MKKFRW zu einer Freisetzung von ACh führt und ob SCCC für diese Freisetzung verantwortlich sind.

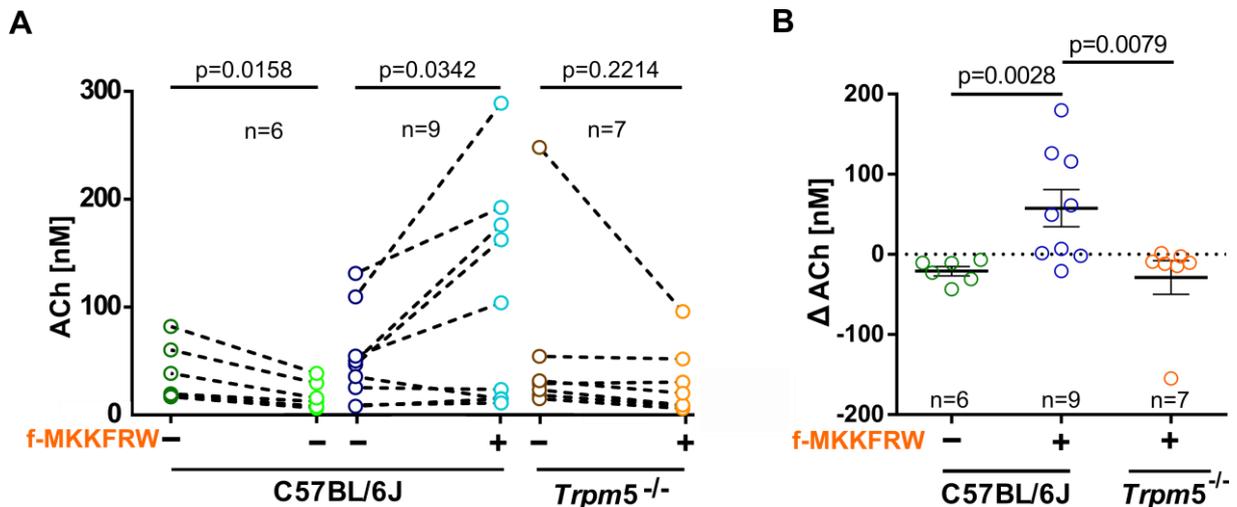
#### 3.6.1 ACh-Freisetzung durch SCCC nach Stimulation mit f-MKKFRW

Um zu untersuchen, ob f-MKKFRW zu einer Freisetzung von ACh in der Trachea der Maus führt, wurde abermals das Modell der explantierten Trachea verwendet. Hierzu wurde die Trachea explantiert und Überstände vor und nach Applikation von f-MKKFRW (10  $\mu$ M) gewonnen. Diese Überstände wurden mit zwei verschiedene Methodiken analysiert. Zum einem wurde der ACh-Gehalt in den Überständen direkt über HPLC, zum anderen indirekt unter Verwendung von Reporterzellen, welche den muskarinischen Rezeptor 3 exprimieren, bestimmt.

##### 3.6.1.1 HPLC

Die HPLC-Messungen wurden von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Klein am Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmazie der Goethe Universität Frankfurt durchgeführt. Die Probenherstellung, Aufbereitung und Auswertung erfolgte durch mich am Institut für Anatomie und Zellbiologie. Der Überstand von explantierten Tracheen nach 15-minütiger Inkubation beinhaltete bereits  $47,1 \pm 9,4$  nM ACh (n=15). Wurde im Anschluss an diese Inkubationszeit f-MKKFRW appliziert, erhöhte sich die ACh-Konzentration von  $52,3 \pm 14,1$  auf  $110,0 \pm 33,6$  nM ( $p=0,0342$ ; gepaarter t-Test; n=9). Erfolgte dagegen keine Applikation von f-MKKFRW, sondern nur die Applikation von frischem Medium, verringerte sich die Menge von ACh im Überstand nach erneuter Inkubation von  $39,4 \pm 6,3$  auf  $18,5 \pm 2,6$  nM ( $p=0,0158$ ; gepaarter t-Test; n=6). Im Gegensatz dazu führte die Applikation von f-MKKFRW in Tracheen von *Trpm5*<sup>-/-</sup>-Tieren nicht zu einer Erhöhung der ACh-Konzentration ( $p=0,2214$ ; gepaarter t-Test; n=7) (Abb. 69A). Vergleicht man die Änderung der ACh-Konzentration ( $\Delta$  ACh) von Tracheen von C57BL/6J-Tieren mit und ohne Applikation von f-MKKFRW, unterscheidet sich diese ebenso (+ f-MKKFRW =  $57,6 \pm 23,1$ ; - f-MKKFRW =  $-20,9 \pm 3,7$  nM;  $p=0,0028$ ; n=6-9; Mann-Whitney-U-Test). Vergleicht man die Änderung der ACh-Konzentration zwischen Tracheen von C57BL/6J- und *Trpm5*<sup>-/-</sup>-Tieren jeweils nach Applikation

von f-MKKFRW, so unterscheiden sich diese ebenso ( $Trpm5^{-/-}$  =  $-28,8 \pm 21,1$  nM;  $p=0,0079$ ;  $n=7-9$ ; Mann-Whitney-U-Test) (Abb. 69B) (Appendix Tab. 40).



**Abbildung 69: ACh-Freisetzung nach Applikation von f-MKKFRW.** **A:** Dargestellt ist der Acetylcholingehalt in Überständen von explantierten Tracheen. Diese wurden für 15 min inkubiert, anschließend wurde der Überstand entnommen und erneut Medium mit oder ohne f-MKKFRW appliziert und für 15 min inkubiert. Die Inkubation von Tracheen ohne Applikation von f-MKKFRW führte zu einer Abnahme der ACh-Konzentration ( $p=0,0158$ ). Die Gabe von f-MKKFRW führte nur in Tracheen von C57BL/6J-Tieren ( $p=0,0342$ ), jedoch nicht in Tracheen von  $Trpm5^{-/-}$ -Tieren ( $p=0,2214$ ) zu einer Erhöhung der ACh-Konzentration. **B:** Auswertung der Experimente dargestellt in A. Berechnet wurde die Änderung der ACh-Konzentration ( $\Delta$  ACh). **A:** Gepaarter t-Test. **B:** Mittelwert  $\pm$  SEM; Mann-Whitney-U-Test. **A:** Modifiziert aus Perniss et al. 2020b.

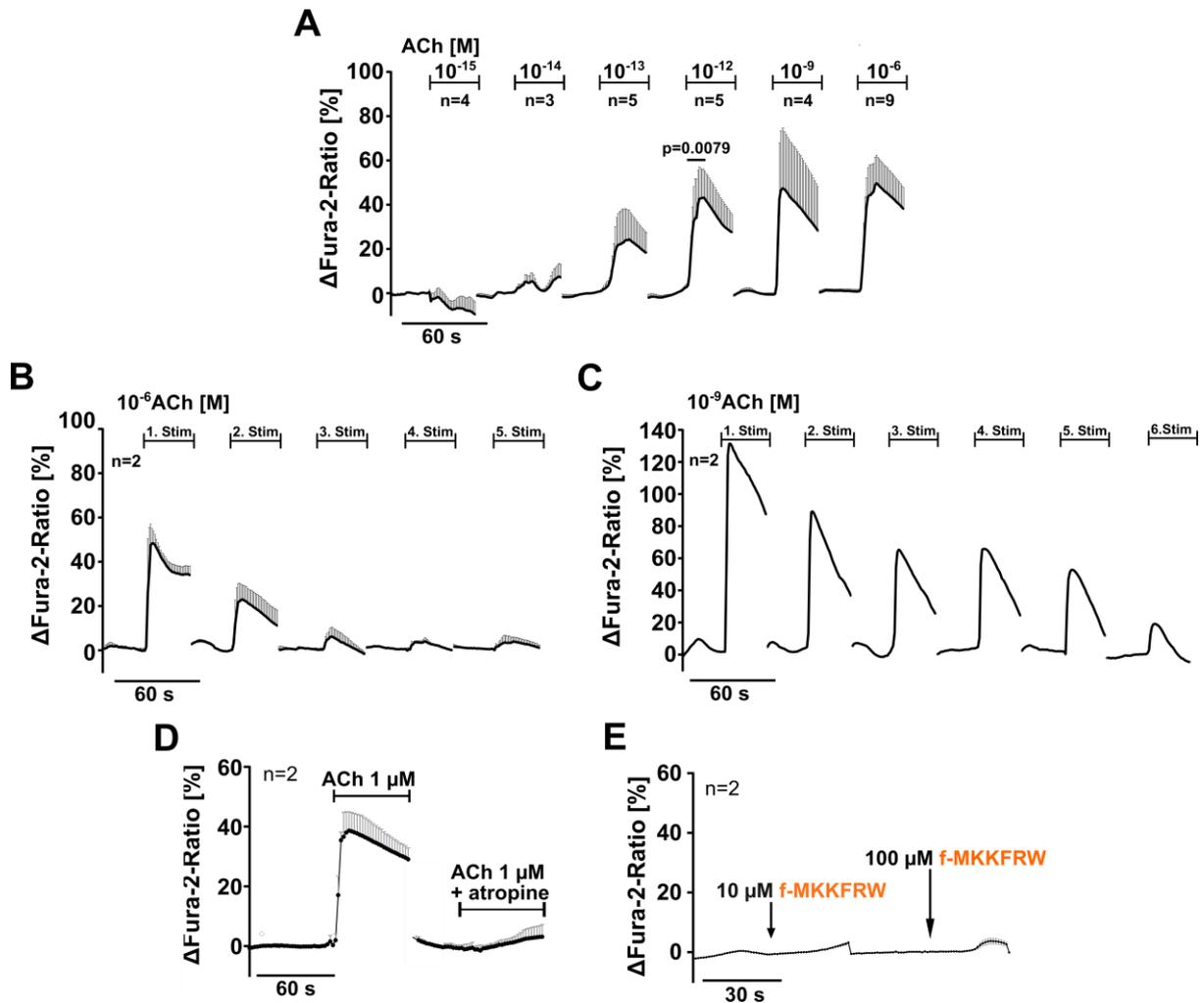
Diese Versuche lassen die Schlussfolgerung zu, dass ACh in trachealen Überständen vorhanden ist. Zudem konnte die ACh-Konzentration durch die Applikation von f-MKKFRW gesteigert werden, diese Steigerung war zudem  $Trpm5$ -abhängig.

### 3.6.1.2 M3R-Reporterzellen

Der Acetylcholingehalt in den Überständen wurde mit einer weiteren Methode bestimmt. Hierzu wurden Reporterzellen (CHO-K1) verwendet, welche den muskarinischen Rezeptor 3 exprimieren, diese dienen als Biosensorzellen (M3-Reporterzellen). Die Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Lucas Delventhal vom Institut für Anatomie und Zellbiologie durchgeführt, dabei übernahm dieser teilweise die Auswertung der Rohdaten. Die Reporterzellen wurden auf Deckgläschen ausgesät und mit dem Calciumindikator Fura-2AM beladen. Anschließend erfolgte die Applikation der trachealen Überstände, welche teilweise schon für HPLC-Messungen genutzt wurden. Am Ende jeder Messung wurde als Vitalitätskontrolle 1  $\mu$ M ACh appliziert. In die Auswertung gingen nur Reporterzellen ein, welche entweder auf die Überstände oder ACh mit einem Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  um  $>10\%$  reagiert hatten; dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aller reagierenden Zellen auf einem *Coverslip*. Die Gabe von ACh führt bei diesen Zellen zu einem Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$ , so führte bereits die

Applikation von einem picomolar ( $10^{-12}$  M) ACh zu einem Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  um  $48,2 \pm 13,3\%$  ( $p=0,0079$ ;  $n=5$ ; Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-test) (Abb. 70A). Die repetitive Applikation von  $10^{-6}$  M ACh führte bereits bei der zweiten Applikation zu einer verringerten Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$ , dies konnte ebenso bei einer Konzentration von  $10^{-9}$  M ACh beobachtet werden ( $n=2$ ), wenn auch in geringererem Maße (Abb. 70B und C). Aus diesem Grund wurde in den folgenden Versuchen für jeden getesteten Überstand ein neuer *Coverslip* mit neuen Zellen verwendet. Um zu prüfen, ob der beobachtete Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  nach ACh-Gabe durch die Bindung von ACh an muskarinische Rezeptoren verursacht wurde, erfolgte die Applikation des muskarinischen Rezeptorantagonisten Atropin zusammen mit ACh. Diese führte zu einem sichtbar verminderten Anstiegs der  $[Ca^{2+}]_i$  im Vergleich zu der alleinigen Applikation von ACh ( $n=2$ ) (Abb. 70D). Zudem wurde getestet, ob die Applikation von f-MKKFRW ( $10 \mu\text{M}$  und  $100 \mu\text{M}$ ) zu einer Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  in den Reporterzellen führt; dies war jedoch nicht der Fall ( $n=2$ ) (Abb. 70E). Diese Vorversuche validierten die Reporterzellen als weiteres geeignetes Modell, um die ACh-Konzentration in Überständen zu untersuchen.

Um zu untersuchen, ob und wieviel biologisch aktives ACh sich in den trachealen Überständen befindet, wurden die zuvor charakterisierten M3-Reporterzellen verwendet. Als Proben dienten die gleichen Überstände, welche zuvor bereits für die ACh-Messungen mittels HPLC verwendet wurden. Zusätzlich wurden weitere Inkubationen durchgeführt, um die Probenanzahl zu erhöhen. Jeder Überstand wurde mindestens auf zwei verschiedene Deckgläschen appliziert, welche jeweils unabhängig voneinander untersucht wurden. Im Anschluss wurde der Mittelwert der beiden untersuchten Deckgläschen gebildet und dargestellt. Die Applikation der trachealen Überstände nach 15-minütiger Inkubation führte zu einem Anstieg der prozentualen Fura-2-Ratio von  $101 \pm 1$  auf  $170 \pm 20 \%$  ( $p=0,0435$ ; gepaarter t-Test;  $n=4$ ) (Abb. 71A und B). Als Grundwert wurde jeweils die durchschnittliche Fura-2-Ratio vor der Applikation bestimmt (Mittelwert von 5 Werten). Die Applikation des trachealen Überstandes nach erneuter Inkubation der gleichen Trachea führte ebenfalls zu einem Anstieg der prozentualen Fura-2-Ratio von  $100 \pm 1$  auf  $124 \pm 3 \%$  ( $p=0,0018$ ; gepaarter t-Test;  $n=4$ ) (Abb. 71A und C). Vergleicht man die prozentualen Fura-2-Ratio-Anstiege miteinander, so unterscheiden sich diese nicht voneinander, jedoch ist eine Tendenz zur Abnahme des Anstieges verursacht durch die zweite Probe im Vergleich zu der ersten Probe zu beobachten ( $p=0,0692$ ; ungepaarter t-Test;  $n=4$ ) (Abb. 71D).



**Abbildung 70: Validierung der den muskarinischen Rezeptor 3 exprimierenden Reporterzellen (M3-Reporterzellen) als geeignetes Modell zur Bestimmung der ACh-Konzentration in trachealen Überständen. A:** Applikation verschiedener Konzentrationen von ACh ( $10^{-15}$ - $10^{-6}$ M) und deren Einfluss auf die  $[Ca^{2+}]_i$ ; abgebildet sind jeweils 30 s vor und nach Applikation von ACh. Bereits die Applikation von  $10^{-12}$  M ACh führt zu einem Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  ( $p=0,0079$ ). **B** und **C:** Repetitive Applikation von  $10^{-6}$  M (**B**) und  $10^{-9}$  M (**C**) ACh. Zwischen den Applikationen erfolgte ein zweiminütiger Waschschrift. Die erneute Applikation von ACh führt zu einem geringeren Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  als die zuvor gehende. **D:** Applikation von ACh ( $10^{-6}$  M) mit anschließender Gabe von ACh ( $10^{-6}$  M) + Atropin (1  $\mu$ M), zwischen den Applikationen erfolgte ein zweiminütiger Waschschrift. Die Applikation von Atropin verhindert den erneuten Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  durch ACh. **E:** Die Applikation von f-MKKFRW (10 und 100  $\mu$ M) führt zu keinem Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$ . **A-E:** n = Anzahl der untersuchten Coverslips; Mittelwert + SEM. Daten aus mindestens zwei voneinander unabhängigen Experimenten. **B:** Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test. **A, D, E:** Modifiziert aus Perniss et al. 2020b.

Im nächsten Experiment wurde nun während der zweiten Inkubationsphase f-MKKFRW (10  $\mu$ M) appliziert. Abermals verursachte die Gabe des Überstandes der 1. Inkubation ohne f-MKKFRW einen Anstieg der prozentualen Fura-2-Ratio von  $100 \pm 1$  auf  $135 \pm 6$  % ( $p=0,0001$ ; gepaarter t-Test;  $n=11$ ) (Abb. 71E und F). Die Applikation des Überstandes der 2. Inkubation mit f-MKKFRW führte zu einem Anstieg der prozentualen Fura-2-Ratio von  $100 \pm 1$  auf  $175 \pm$

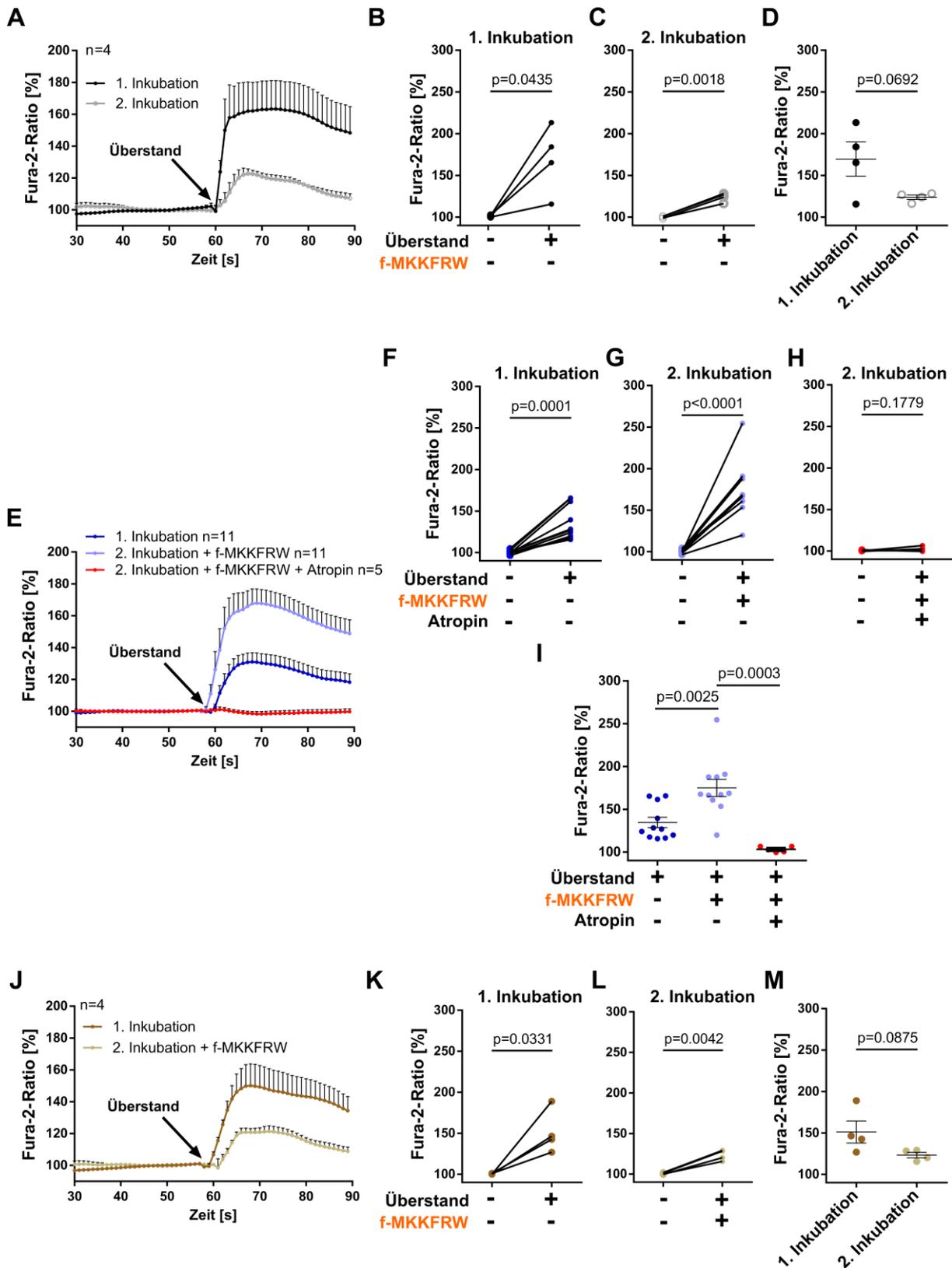
10 % ( $p < 0,0001$ ; gepaarter t-Test;  $n=11$ ) (Abb. 71E und G). In einem weiteren Experiment wurde Atropin vor der Gabe des Überstandes appliziert, als Proben hierzu dienten 5 der 11 zweiten Inkubationsproben (mit f-MKKFRW inkubiert). Die Applikation dieser Überstände mit vorheriger Gabe von Atropin führte zu keinem Anstieg der prozentualen Fura-2-Ratio ( $p=0,1779$ ; gepaarter t-Test;  $n=5$ ) (Abb. 71E und H). Vergleicht man die Anstiege der prozentualen Fura-2-Ratios verursacht durch Überstände der 1. Inkubation mit denen der 2. Inkubation (mit f-MKKFRW), so unterscheiden diese sich. Die Überstände der zweiten Inkubation verursachten einen um ~40 % höheren Anstieg der prozentualen Fura-2-Ratio ( $p=0,0025$ ; ungepaarter t-Test;  $n=11$ ) (Abb. 71I). Vergleicht man die Veränderungen der prozentualen Fura-2-Ratios verursacht durch Überstände der 2. Inkubation (mit f-MKKFRW) und zusätzlicher Gabe von Atropin mit denen ohne Atropin-Gabe, so unterschieden diese sich ebenfalls ( $p=0,0003$ ; ungepaarter t-Test;  $n=5-11$ ) (Abb. 71I).

Um zu untersuchen, ob SCCC bzw. Komponenten der Geschmackstransduktionskaskade an der Ausschüttung von ACh nach f-MKKFRW Stimulation beteiligt sind, wurden die Versuche mit Trpm5-KO-Tieren wiederholt. Hierzu wurden die Überstände verwendet, welche bereits für die ACh-Messungen mittels HPLC gewonnen wurden. Die Applikation der Überstände nach 1. Inkubation ohne f-MKKFRW führte auch hier wieder zu einem Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$ ; so stieg die prozentuale Fura-2-Ratio von 100 auf  $151 \pm 13$  % ( $p=0,0331$ ; gepaarter t-Test;  $n=4$ ) (Abb. 71J und K). Auch die Applikation der Überstände aus der 2. Inkubation mit f-MKKFRW führte zu einem Anstieg der prozentualen Fura-2-Ratio von 100 auf  $123 \pm 3$  % ( $p=0,0042$ ; gepaarter t-Test;  $n=4$ ) (Abb. 71J und L). Vergleicht man die Anstiege der prozentualen Fura-2-Ratios, welche durch die Überstände der 1. und 2. Inkubation verursacht wurden, miteinander, so unterscheiden diese sich nicht signifikant voneinander ( $p=0,0875$ , gepaarter t-Test;  $n=4$ ) (Abb. 71M), jedoch war wie bei den Versuchen mit Überständen von nicht stimulierten C57BL/6J-Tracheen (Abb. 71A, D) eine Tendenz zu beobachten ( $p=0,0692$ ), dass die Überstände aus der zweiten Inkubation zu einer geringeren Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  führten.

Um zu untersuchen, ob sich die Änderungen der  $[Ca^{2+}]_i$  zwischen den einzelnen Behandlungen und Mausstämmen unterschieden, wurde die  $\Delta$ Fura-2-Ratio bestimmt. Hierzu wurde die prozentuale Änderung der Fura-2-Ratio, verursacht durch die Überstände aus der 2. Inkubation, von der prozentuale Änderung der Fura-2-Ratio, verursacht durch die Überstände aus der 1. Inkubation, subtrahiert. Ein negativer Wert sagt somit aus, dass der Überstand aus der 2. Inkubation zu einer geringeren Veränderung der  $[Ca^{2+}]_i$  im Vergleich zu der 1. Inkubation führte und somit im Überstand aus der 2. Inkubation weniger ACh vorhanden war als im Überstand aus der 1. Inkubation. Ein positiver Wert dagegen legt nahe, dass mehr ACh im Überstand aus der 2. Inkubation im Vergleich zur 1. Inkubation vorhanden war. Die  $\Delta$ Fura-2-Ratio aus den Versuchen mit Überständen ohne f-MKKFRW-Applikation (Abb. 71A und D)

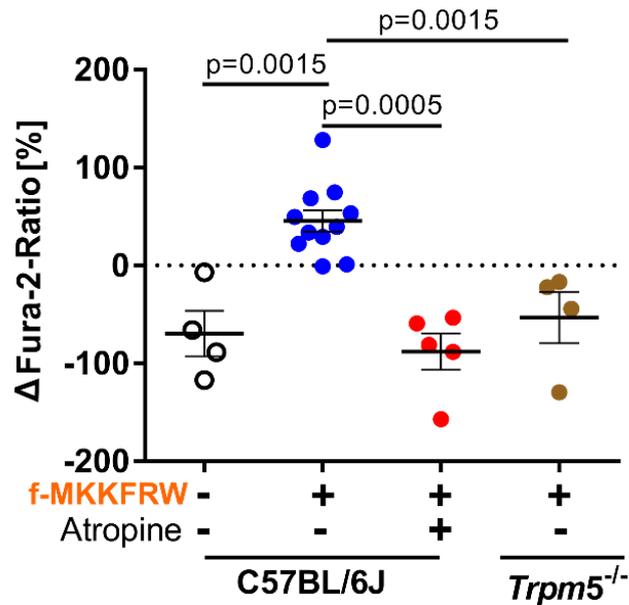
betrug  $-70 \pm 23 \%$  (n=4), dagegen betrug das  $\Delta$ Fura-2-Ratio der Überstände mit f-MKKFRW-Applikation  $45 \pm 11 \%$  (n=11) (Abb. 71E und I). Vergleich man beide  $\Delta$ Fura-2-Ratios miteinander, so unterscheiden diese sich ( $p=0.0015$ ; Mann-Whitney-U-Test) (Abb. 72). Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die Applikation von f-MKKFRW zu einer vermehrten Freisetzung von ACh führte. Die  $\Delta$ Fura-2-Ratio der Versuche mit f-MKKFRW- und Atropin-Gabe war ebenfalls negativ ( $-88 \pm 19 \%$ ; n=5), vergleicht man diese mit der  $\Delta$ Fura-2-Ratio aus den Versuchen mit f-MKKFRW, aber ohne Atropin-Applikation, so unterschieden sich diese ebenfalls ( $p=0,0005$ ; Mann-Whitney-U-Test) (Abb. 72). Die  $\Delta$ Fura-2-Ratio der Versuche mit f-MKKFRW-Applikation von Überständen aus Tracheen von *Trpm5*-Ko-Tieren war ebenfalls negativ ( $-53 \pm 26 \%$ ; n=5). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die ACh-Freisetzung durch f-MKKFRW in *Trpm5*-Ko Tieren vermindert war. Vergleicht man diese mit den  $\Delta$ Fura-2-Ratio-Werten aus den Versuchen mit Überständen der C57BL/6J-Tiere und f-MKKFRW-Applikation, so unterscheiden diese sich ebenfalls ( $p=0.0015$ ; Mann-Whitney-U-Test) (Abb. 72).

Aus diesen Versuchen mit M3-Reporterzellen lässt sich schlussfolgern, dass in trachealen Überständen biologisch aktives ACh vorhanden ist. Die Stimulation der Trachea mit f-MKKFRW führte zudem zu einer verstärkten Freisetzung von ACh, welche TRPM5-abhängig war. Diese Versuche unterstützen die bereits beschriebenen Ergebnisse der ACh-Messungen mittels HPLC.



**Abbildung 71: Messungen der  $[Ca^{2+}]_i$  von M3-Reporterzellen zur Bestimmung der ACh-Konzentration in trachealen Überständen.** **A:** Applikation von trachealen Überständen von C57BL/6J-Mäusen. Die Trachea wurde für 15 min inkubiert, anschließend wurde der Überstand entnommen (1. Inkubation) und erneut Medium appliziert, nach erneuter 15-minütiger Inkubation wurde auch dieser Überstand entnommen (2. Inkubation). Die Applikation beider Überstände führt zu einer Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$ . **B-D:** Auswertung der in A dargestellten

Experimente. **B:** Die Applikation des Überstandes aus der 1. Inkubationsphase führt zu einem Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  ( $p=0.0435$ ; gepaarter t-Test). **C:** Die Applikation des Überstandes aus der 2. Inkubationsphase führt zu einem Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  ( $p=0.0018$ , gepaarter t-Test). **D:** Die Anstiege der  $[Ca^{2+}]_i$ , verursacht durch die Überstände aus der 1. und 2. Inkubation, unterscheiden sich nicht signifikant voneinander ( $p=0.0692$ ; Mann-Whitney-U-Test). **E:** Applikation von trachealen Überständen von C57BL/6J-Mäusen. Die Trachea wurde für 15 min inkubiert, anschließend wurde der Überstand entnommen (1. Inkubation) und erneut Medium appliziert, zum Medium wurde ebenfalls f-MKKFRW (10  $\mu$ M) hinzugegeben, nach erneuter 15-minütiger Inkubation wurde auch dieser Überstand entnommen (2. Inkubation). Die Applikation beider Überstände führt zu einer Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$ . Die Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  durch den Überstand der 2. Inkubation kann durch die vorherige Applikation von Atropin (1  $\mu$ M) verhindert werden. **F-I:** Auswertung der in E dargestellten Experimente. **F:** Die Applikation des Überstandes aus der 1. Inkubationsphase führt zu einem Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  ( $p=0.0001$ ; gepaarter t-Test). **G:** Die Applikation des Überstandes aus der 2. Inkubationsphase (mit f-MKKFRW) führt zu einem Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  ( $p<0.0001$ ; gepaarter t-Test). **H:** Die Applikation von Atropin und des Überstandes aus der 2. Inkubationsphase (mit f-MKKFRW) führt zu keinem Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  ( $p=0.1779$ ; gepaarter t-Test). **I:** Die Anstiege der  $[Ca^{2+}]_i$ , verursacht durch die Überstände aus der 1. und 2. Inkubation, unterscheiden sich signifikant voneinander ( $p=0.0025$ ; Mann-Whitney-U-Test), ebenso unterscheiden sich die Anstiege der  $[Ca^{2+}]_i$  zwischen der Applikation des Überstandes aus der 2. Inkubationsphase mit oder ohne zu voriger Atropin-Gabe ( $p=0.0003$ ; Mann-Whitney-U-Test). **J:** Applikation von trachealen Überständen von *Trpm5*-Ko-Mäusen. Die Trachea wurde für 15 min inkubiert, anschließend wurde der Überstand entnommen (1. Inkubation) und erneut Medium appliziert, zum Medium wurde f-MKKFRW (10  $\mu$ M) hinzugegeben, nach erneuter 15-minütiger Inkubation wurde auch dieser Überstand entnommen (2. Inkubation). Die Applikation beider Überstände führt zu einer Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$ . **K:** Die Applikation des Überstandes aus der 1. Inkubationsphase führt zu einem Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  ( $p=0.0331$ ; gepaarter t-Test). **L:** Die Applikation des Überstandes aus der 2. Inkubationsphase (mit f-MKKFRW) führt zu einem Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  ( $p=0.0042$ ; gepaarter t-Test). **M:** Die Anstiege der  $[Ca^{2+}]_i$ , verursacht durch die Überstände aus der 1. und 2. Inkubation, unterscheiden sich nicht signifikant voneinander ( $p=0.0875$ ; Mann-Whitney-U-Test). **A, E, J:** Mittelwert + SEM; n = Anzahl der untersuchten trachealen Überstände (pro Tier 2 Überstände, 1. Inkubation und 2. Inkubation), jeder Überstand wurde auf mindestens zwei *Coverslips* in zwei voneinander unabhängigen Experimenten appliziert. **E:** Modifiziert aus Perniss et al. 2020b.



**Abbildung 72: Auswertung der in Abbildung 71 dargestellten Experimente.** Dargestellt ist die Differenz der prozentualen Veränderung der Fura-2-Ratio zwischen den Überständen aus der 1. und 2. Inkubation ( $\Delta$ Fura-2-Ratio; prozentuale Veränderung der Fura-2-Ratio 2. – 1. Inkubation). Die Applikation von f-MKKFRW führte zu einer positiven  $\Delta$ Fura-2-Ratio, diese unterschied sich von den  $\Delta$ Fura-2-Ratio ohne Applikation von f-MKKFRW ( $p=0.0015$ ). Die Applikation von Atropin vor der Gabe des Überstandes aus der 2. Inkubation führte zu einer negativen  $\Delta$ Fura-2-Ratio und unterschied sich von der Applikation des Überstandes ohne Atropin-Gabe ( $p=0.005$ ). Die  $\Delta$ Fura-2-Ratio aus den Versuchen mit Überständen von *Trpm5*-Ko-Tieren war ebenfalls negativ und unterschied sich von der  $\Delta$ Fura-2-Ratio von C57BL/6J-Tieren ( $p=0.0015$ ). Mittelwerte  $\pm$  SEM; Mann-Whitney-U-Test. Modifiziert aus Perniss et al. 2020b.

### 3.6.2 ACh-Freisetzung nach optogenetischer Stimulation durch SCCC

Um die ACh-Freisetzung durch tracheale SCCC in einem weiteren Tiermodell zu überprüfen, wurden Versuche mit *ChAT-ChR2-YFP*-Mäusen durchgeführt. Dieser Mausstamm wurde im Abschnitt 3.2.1.4 bereits genauer beschrieben und charakterisiert. In diesen Mäusen wird der lichtsensitive Ionenkanal ChR2 zusammen mit dem Reporterprotein YFP als Fusionsprotein unter dem Promotor der ChAT exprimiert und in die Zellmembran eingebaut. Durchgeführte Immunmarkierungen zeigten, dass ~81 % aller trachealen SCCC in diesem Mausstamm ChR2-YFP-positiv waren (Abb. 42B). Eine Stimulation dieser ChR2-positiven Zellen mit Licht der Wellenlänge 450-490 nm führt zu einer Öffnung des ChR2-Ionenkanals und zu einem plötzlichen Einstrom von Na<sup>+</sup>-Ionen, was zu einer Depolarisation der Zellmembran führt (Zhao et al. 2011). Die Hypothese dieser Versuche ist es, dass ACh durch die Depolarisation der Zellmembran freigesetzt wird und somit im trachealen Überstand detektiert werden kann. Um diese Hypothese zu testen, wurden abermals Tracheen explantiert und Überstände auf das Vorhandensein und die Quantität von ACh mittels HPLC untersucht; als Stimulus diente dabei die Applikation von Licht mittels einer LED-Diode (2 min; 456 nm; 8 Hz; 60 ms Pulsdauer).

Auch in diesen Versuchen wurden die Tracheen zunächst ohne Stimulation inkubiert (7 min) und der Überstand entnommen (1. Inkubation), danach erfolgte eine weitere Inkubation mit oder ohne vorheriger Applikation von LED-Licht für jeweils 2 (LED) + 5 oder 7 min (2. Inkubation).

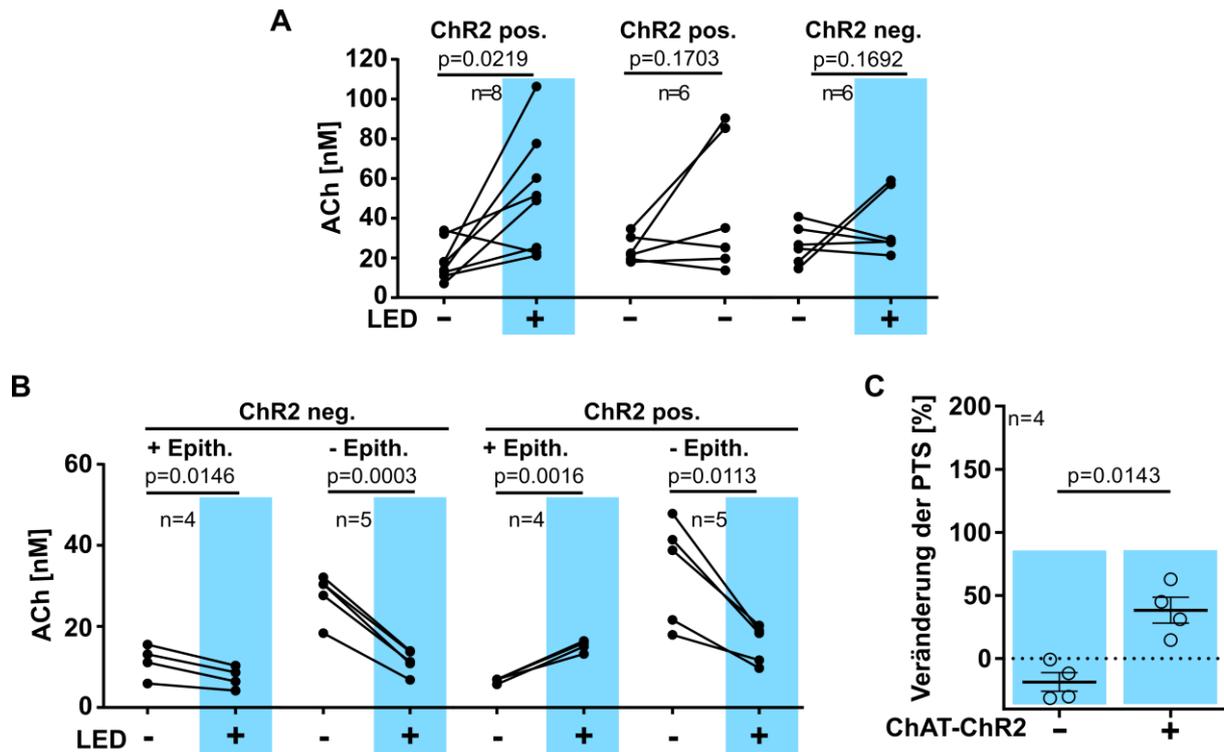
Dabei zeigte sich ähnlich wie bei den bereits vorangegangenen Versuchen, dass in nicht stimulierten trachealen Überständen (1. Inkubation) ACh vorhanden ist. So betrug die ACh-Konzentration im Überstand von Tracheen aus ChR2-positiven Tieren  $18 \pm 3$  nM (1. Inkubation), diese erhöhte sich durch die Beleuchtung mit LED-Licht und nachfolgender Inkubation (2. Inkubation) auf  $52 \pm 11$  nM ( $n=8$ ;  $p=0.0219$ ; gepaarter t-Test) (Abb. 73A). In einem weiteren Experiment mit Tracheen von ChR2-positiven Tieren ohne Beleuchtung mit LED-Licht erhöhte sich die ACh-Konzentration nicht (1. Inkubation =  $24 \pm 3$  nM; 2. Inkubation =  $44 \pm 14$  nM) ( $n=6$ ;  $p=0.1703$ ; gepaarter t-Test) (Abb. 73A). Als weiteres Kontrollexperiment dienten ChR2-negative Tiere, welche die Wurfgeschwister der ChR2-positiven Tieren darstellten. Es wurde ebenfalls LED-Licht vor der 2. Inkubation angewendet, dies führte jedoch nicht zu einer Erhöhung der ACh-Konzentration (1. Inkubation =  $27 \pm 4$  nM; 2. Inkubation =  $37 \pm 7$  nM ( $n=6$ ;  $p=0.1692$ ; gepaarter t-Test) (Abb. 73A) (Appendix Tab. 41).

Um zu untersuchen, ob die ACh-Freisetzung durch SCCC stattfand und nicht durch subepithelial gelegene ebenfalls ChAT-positive Nervenfasern, wurden Experimente durchgeführt, bei denen vor der Inkubation der Trachea das Trachealepithel mechanisch entfernt wurde (Abb. 15, Abschnitt 2.2.1.1.1). Wie in Abb. 41 dargestellt, waren diese Nervenfasern ohne Antikörpermarkierung gegen YFP im Gegensatz zu den SCCC nicht YFP-positiv. Aus diesem Grund kann von einer geringeren Menge des Fusionsproteins YFP-ChR2 in Nervenfasern im Vergleich zu den trachealen SCCC ausgegangen werden. Da diese Experimente zeitlich versetzt zu den vorherigen stattfanden, wurden alle Kontrollexperimente nochmals wiederholt. Auch hier zeigte sich, dass in Überständen von unstimulierten Tracheen ChR2-neg.-Tiere ACh vorhanden war; eine Beleuchtung mit LED-Licht führte auch in diesen Versuchen zu keinem Anstieg der ACh-Konzentration, sondern zu einer Abnahme (1. Inkubation =  $11 \pm 2$  nM; 2. Inkubation =  $7 \pm 1$  nM) ( $p=0.0146$ ;  $n=4$ ; gepaarter t-Test) (Abb. 73B). Die Entfernung des Trachealepithels von ChR2-neg.-Tracheen führte zu einer höheren ACh-Konzentration von  $28 \pm 3$  nM im Überstand nach der 1. Inkubation. Diese nahm jedoch ebenso nicht durch die Beleuchtung mit LED-Licht zu ( $12 \pm 1$  nM), sondern eine Abnahme der ACh-Konzentration konnte ebenfalls festgestellt werden ( $p=0.0003$ ;  $n=5$ ; gepaarter t-Test) (Abb. 73B). In Trachealüberständen von ChR2-pos-Tieren führte die Beleuchtung mit LED-Licht zu einer Erhöhung der ACh-Konzentration (1. Inkubation =  $7$  nM; 2. Inkubation =  $16 \pm 1$  nM) ( $p=0.0016$ ;  $n=4$ ; gepaarter t-Test) (Abb. 73B). Dagegen führte die Entfernung des Trachealepithels von Tracheen ChR2-pos.-Tiere zu einem Ausbleiben der Erhöhung der ACh-

Konzentration durch die Applikation von LED-Licht (1. Inkubation =  $34 \pm 6$  nM; 2. Inkubation =  $16 \pm 2$  nM) ( $p=0.00113$ ;  $n=5$ ; gepaarter t-Test) (Abb. 73B) (Appendix Tab. 42).

In einem weiteren Experiment sollte untersucht werden, ob das durch die LED-Licht-Stimulation freigesetzte ACh eine Erhöhung der PTS verursacht. Dazu wurden PTS-Messungen an ChR2-pos und ChR2-neg Tieren durchgeführt; die Stimulation erfolgte nach dem gleichen Schema wie für die ACh-Messungen. Dabei zeigte sich, dass LED-Licht-Stimulation nur in Tracheen von ChR2-pos.-Tieren zu einer Erhöhung der PTS um  $39 \pm 10$  % führte. In Tracheen von ChR2-neg.-Tieren führte die LED-Licht-Stimulation zu keinem Anstieg der PTS, diese wurde eher vermindert (Reduktion um  $18 \pm 7$  %). Vergleicht man die durch LED-Licht verursachten Veränderungen der PTS beider Genotypen miteinander, so unterschieden diese sich ( $p=0.0143$ ; Mann-Whitney-U-Test;  $n=4$ ) (Abb. 73C) (Appendix Tab. 43).

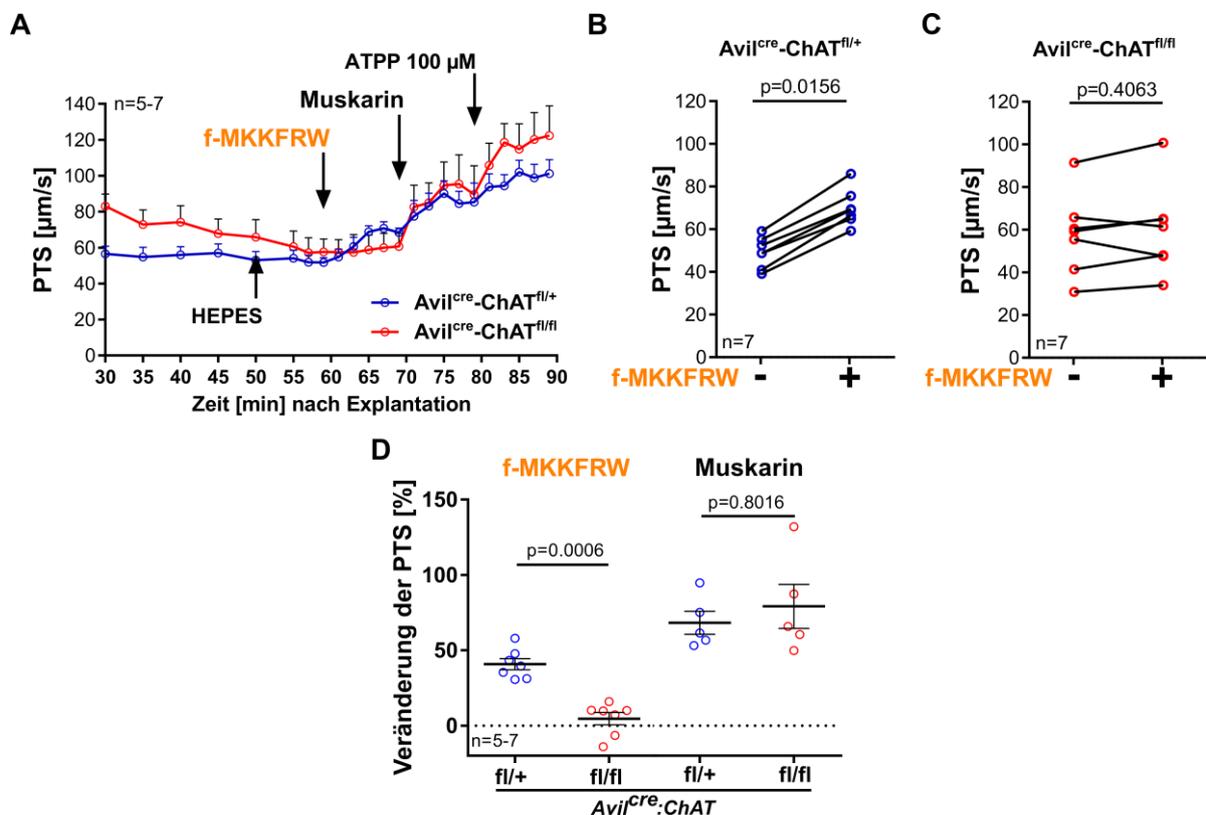
Durch die Verwendung dieses optogenetischen Mausmodelles konnte ebenfalls gezeigt werden, dass ChAT-positive Epithelzellen ACh freisetzen können, was wiederum die PTS positiv beeinflusste.



**Abbildung 73: ACh-Freisetzung nach optogenetischer Stimulation. A-B:** Dargestellt ist der ACh-Gehalt in Überständen von explantierten Tracheen. Diese wurden für 7 min inkubiert, anschließend wurde der Überstand entnommen und erneut Medium appliziert. Es folgte entweder eine Stimulation durch eine LED-Diode (2 min; 456 nm; 8 Hz; 60 ms Pulsdauer) mit anschließender Inkubation für 5 min, oder die Trachea wurde ohne Stimulation für 7 min inkubiert. Die ACh-Konzentration in den Überständen wurde mittels HPLC bestimmt. **A:** Die LED-Licht-Stimulation führt zu einem Anstieg der ACh-Konzentration in trachealen Überständen von Chr2-pos.-Tieren ( $p=0.0219$ ), jedoch nicht in denen von Chr2-neg.-Tieren ( $p=0.1703$ ). Die Inkubation der Trachea ohne Applikation von LED-Licht führt zu keiner Änderung der ACh-Konzentration ( $p=0.1703$ ). **B:** Das Trachealepithel wurde mechanisch entfernt (-Epith.) oder das Epithel wurde nicht Entfernt (+Epith.). Die LED-Licht-Stimulation führt zu einem Anstieg der ACh-Konzentration in trachealen Überständen von Chr2-pos.-Tieren mit Epithel ( $p=0.0016$ ), jedoch nicht in denen ohne Epithel; hier kann eine Abnahme der ACh-Konzentration festgestellt werden ( $p=0.0113$ ). In Chr2-neg. Tieren konnte sowohl mit als auch ohne LED-Licht-Stimulation eine Verringerung der ACh-Konzentration beobachtet werden ( $p=0.0146$ ;  $p=0.0003$ ). **C:** PTS-Messungen an Chr-2-pos.- und neg.-Tieren. Die LED-Licht-Applikation erfolgte nach dem gleichen Schema und führte in Chr-2-pos-Tieren zu einem Anstieg der PTS, jedoch nicht in Chr-2-neg-Tieren ( $p=0.0143$ ). A-B: Gepaarter t-Test. C: Mittelwert  $\pm$  SEM; Mann-Whitney-U-Test. Modifiziert aus Perniss et al. 2020b.

### 3.6.3 Zelltypspezifische Deletion der ChAT in SCCC

Als weiteres Modell, um zu prüfen, ob die Applikation von f-MKKFRW zu einer Freisetzung von ACh aus SCCC führt, wurde das Acetylcholin produzierende Enzym ChAT spezifisch in SCCC deletiert. Hierzu wurden die beiden Mausstämme *Avil<sup>cre</sup>* und *ChAT<sup>fl</sup>* miteinander verpaart. Dies resultierte in einer Deletion der ChAT in allen Advillin exprimierenden Zellen. In der Abb. 44 wurde gezeigt, dass Villin-immunreaktive Zellen im Trachealepithel zu finden sind. Einzelzellsequenzierungsdaten, Immunmarkierungen und eigene unveröffentlichte Daten legen jedoch nahe, dass SCCC das sehr sequenzähnliche Protein Advillin exprimieren (Ualiyeva et al. 2020; Ruppert et al. 2020; Plasschaert et al. 2018). Die Validierung dieses Mausmodells fand durch Prof. Burkhard Schütz an der Universität Marburg statt.



**Abbildung 74: Veränderung der PTS durch f-MKKFRW und Muskarin in *Avil<sup>cre</sup>-ChAT<sup>fl</sup>*-Mäusen.** **A:** Dargestellt ist der Kurvenverlauf von jeweils 5 Experimenten an Tracheen von *Avil<sup>cre</sup>-ChAT<sup>fl/+</sup>* (Wt) und *Avil<sup>cre</sup>-ChAT<sup>fl/fl</sup>*-Mäusen (Ko), appliziert wurde f-MMKFRW (10  $\mu\text{M}$ ) und darauffolgend Muskarin (100  $\mu\text{M}$ ) (Mittelwert + SEM). **B-D:** Auswertung der in A abgebildeten Experimente. **B und C:** PTS-Werte vor Applikation von f-MKKFRW und 8 min nach Applikation. In den Kontrolltieren führt die Gabe von f-MKKFRW zu einem Anstieg der PTS ( $p=0,0156$ ), nicht jedoch in den *Avil<sup>cre</sup>-ChAT<sup>fl/fl</sup>*-Tieren ( $p=0,4063$ ). **D:** Der prozentuale Anstieg der PTS 8 min nach f-MKKFRW-Applikation ist in den *Avil<sup>cre</sup>-ChAT<sup>fl/fl</sup>*-Tieren im Vergleich zu den Wt-Kontrolltieren verringert ( $p=0,0006$ ). Die Applikation von Muskarin führt in beiden Genotypen zu einem gleichstarken Anstieg der PTS ( $p=0,8016$ ). B und C: Wilcoxon-Rangsummentest. D: Mittelwert  $\pm$  SEM, Mann-Whitney-U-Test. **D:** Modifiziert aus Perniss et al. 2020b.

Die Applikation von f-MKKFRW führte in den Kontrolltieren (*Avi<sup>cre</sup>-ChAT<sup>fl/+</sup>*) zu einem Anstieg der PTS von  $51,8 \pm 2,7$  auf  $72,5 \pm 3,2$   $\mu\text{m/s}$ . Dies entspricht einer Erhöhung um  $40,8 \pm 3,7$  % ( $p=0,0156$ ;  $n=7$ ; gepaarter t-Test) (Abb. 42A, B und D). In den Tieren, in denen die ChAT in SCCC ablatiert wurde (*Avi<sup>cre</sup>-ChAT<sup>fl/fl</sup>*), führte die Applikation von f-MKKFRW dagegen zu keiner Steigerung der PTS ( $57,6 \pm 7,2$  auf  $60,0 \pm 8$   $\mu\text{m/s}$ ) ( $p=0,4063$ ;  $n=7$ ; Wilcoxon-Test) (Abb. 74A, C und D). Vergleicht man diese Anstiege miteinander so unterscheiden diese sich ( $p=0,0006$ ; Mann-Whitney-U-Test) (Abb. 74D). Die anschließende Gabe von Muskarin (100  $\mu\text{M}$ ) führte in beiden Genotypen zu einem Anstieg der PTS, welcher auch quantitativ nicht unterschiedlich war ( $p=0,8016$ ;  $n=5$ ;  $p=0,4063$ ;  $n=7$ ; Wilcoxon-Test) (Abb. 74A und D) (Appendix Tab. 44).

### 3.6.4 Cholinerge Signalübermittlung von SCCC zu zilientragenden Zellen nach

#### Stimulation durch formylierte Peptide

##### 3.6.4.1 Rolle muskarinischer ACh-Rezeptoren

Die Ergebnisse der bisherigen Versuche legen nahe, dass nach einer Applikation von f-MKKFRW ACh durch SCCC freigesetzt wird und sich dadurch die Zilienschlagfrequenz der benachbarten zilientragenden Zellen erhöht. Mit Hilfe der nächsten Versuche sollte geklärt werden, ob das freigesetzte ACh direkt auf die zilientragenden Zellen wirkt, welche muskarinische ACh-Rezeptoren exprimieren.

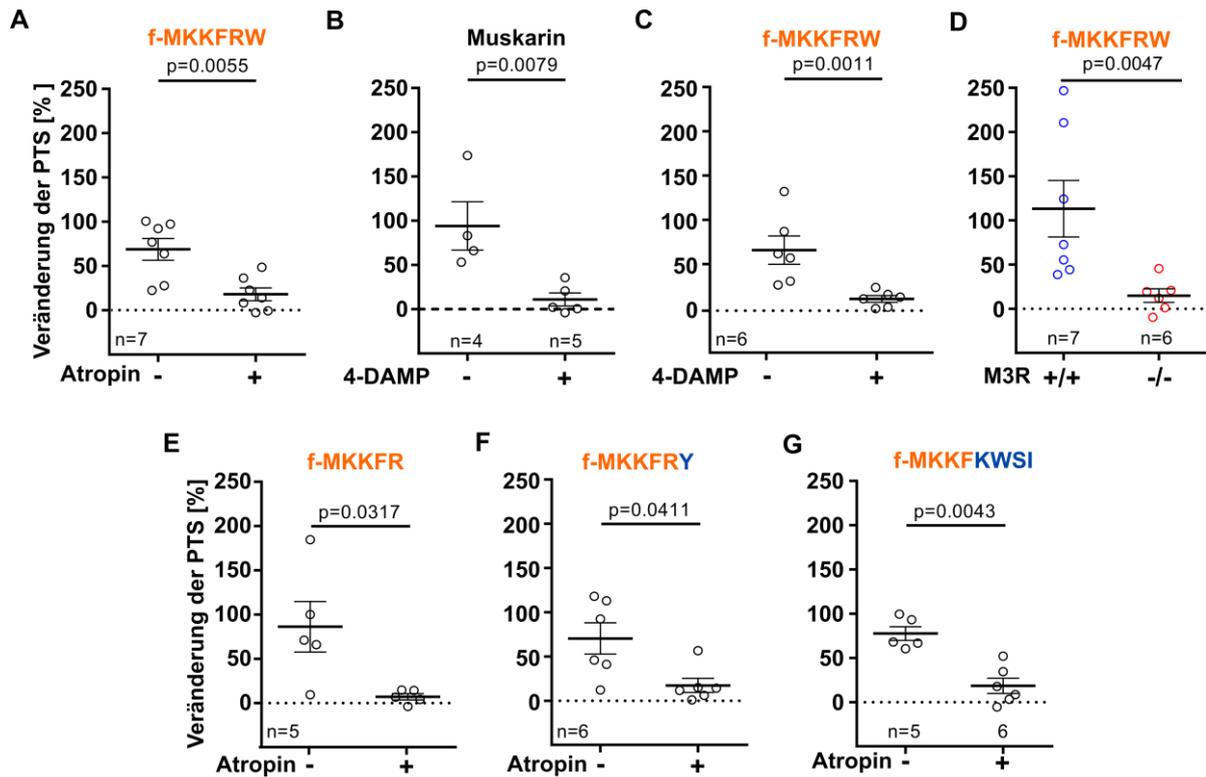
Im Trachealepithel sind sowohl muskarinerge als auch nikotinische ACh-Rezeptoren exprimiert, an welche freigesetztes ACh binden könnte (Hollenhorst et al. 2012; Klein et al. 2009). Sowohl die Applikation von Muskarin als auch die von Nikotin führt zu einem Anstieg der PTS (Klein et al. 2009; Perniss et al. 2020a). Die Applikation von ACh führt ebenso zu einem Anstieg der PTS (Perniss et al. 2020a). Für die Erhöhung der PTS durch Nikotin ist ein heteropentamerer nikotinische ACh-Rezeptor, bestehend aus den Untereinheiten  $\alpha 3\beta 4$ , essentiell (Perniss et al. 2020a). Die Applikation von Nikotin führt in Mäusen, die eine Defizienz für die  $\beta 4$ -Untereinheit aufweisen, zu keiner Steigerung der PTS. Die Wirkung von ACh bleibt jedoch unverändert bestehen (Perniss et al. 2020a). Im Gegensatz dazu ist die Wirkung von Muskarin abhängig von dem muskarinischen ACh-Rezeptor M3; in Mäusen, welche defizient für diesen Rezeptor sind, bleibt die PTS-steigernde Wirkung von Muskarin aus (Klein et al. 2009).

Um zu untersuchen, ob muskarinische ACh-Rezeptoren an der PTS-steigernden Wirkung von f-MKKFRW und dessen Varianten beteiligt sind, erfolgte die Gabe von Atropin (1  $\mu\text{M}$ ), welches einen Inhibitor aller muskarinischen ACh-Rezeptoren darstellt. In der Kontrollgruppe führte die Gabe von f-MKKFRW zu einem Anstieg der PTS von  $46,4 \pm 2,5$  auf  $77 \pm 4,6$   $\mu\text{m/s}$ . Dies entspricht einer Erhöhung um  $68,8 \pm 12,2$  % ( $p=0,0156$ ;  $n=7$ ; Wilcoxon-Rangsummentest).

Wurde Atropin vor der Gabe von f-MKKFRW appliziert, so veränderte sich die PTS nur von  $50,5 \pm 4,7$  auf  $58 \pm 3$   $\mu\text{m/s}$ . Dies entspricht einer Veränderung um  $18,1 \pm 7,2$  % ( $p=0,0781$ ;  $n=6$ ; Wilcoxon-Rangsummentest) (Abb. 75A) (Appendix Tab. 45). Vergleicht man diese prozentualen Veränderungen, verursacht durch f-MKKFRW mit oder ohne vorheriger Applikation von Atropin, so unterscheiden diese sich. Atropin verringert den Effekt von f-MKKFRW um 74 % ( $p=0,00055$ ;  $n=7$ ; Mann-Whitney-U-Test). Um zu untersuchen, ob der muskarinische ACh-Rezeptor M3 der verantwortliche Rezeptortyp ist, wurden im Anschluss Versuche mit dem Inhibitor 4-DAMP (1  $\mu\text{M}$ ) durchgeführt. Dieser Inhibitor bindet bevorzugt an den M3-Rezeptortyp und verhindert so die Bindung von ACh an diesen (Choppin et al. 1998; Hagan et al. 1988). Die Gabe von Muskarin (100  $\mu\text{M}$ ) führte zu einem Anstieg der PTS um  $94,1 \pm 27,3$  %. Wurde zuvor der Inhibitor 4-DAMP appliziert, so stieg die PTS nur noch um  $11,1 \pm 7,4$  % an. Dies entspricht einer Reduktion des muskarin-induzierten Anstiegs der PTS um 88,3 % ( $p=0,0079$ ;  $n=6-7$ ; Mann-Whitney-U-Test) (Abb. 75B) (Appendix Tab. 45). Ebenso verringerte die Applikation von 4-DAMP den Anstieg der PTS durch f-MKKFRW um ~83% im Vergleich zu den Kontrollversuchen mit dem Lösungsmittel DMSO anstatt 4-DAMP ( $p=0,0011$ ;  $n=6$ ; Mann-Whitney-U-Test) (Abb. 75C) (Appendix Tab. 45). Um diese Ergebnisse in einem weiteren Modell zu validieren, wurden Versuche mit Mäusen durchgeführt, welche eine Defizienz des muskarinischen ACh-Rezeptors M3 aufweisen (*M3R-Ko*). Als Kontrolltiere dienten hierbei Tiere mit dem gleichen genetischen Hintergrund, Alter und Geschlecht. In den Kontrollmäusen führte die Applikation von f-MKKFRW zu einem Anstieg der PTS um  $111,4 \pm 31,9$  %, in den Tracheen von *M3R-Ko*-Tieren dagegen erhöhte sich die PTS nur um  $13,7 \pm 7,7$  %. Vergleicht man die beiden durch f-MKKFRW verursachten Anstiege der PTS zwischen *Wt* und *M3R-Ko* miteinander, so liegt eine Reduktion des PTS-Anstiegs um ~87,7 % im *M3R-Ko* vor ( $p=0,0047$ ;  $n=6-7$ ; Mann-Whitney-U-Test) (Abb. 75D) (Appendix Tab. 46).

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die bereits beschriebene Erhöhung der PTS durch die f-MKKFRW-Varianten f-MKKFR, f-MKKFRY und f-MKKFKWSI (Abschnitt 3. 4.1) auch durch die Applikation von Atropin inhibiert werden kann. Dabei zeigte sich, dass die Erhöhung der PTS durch alle drei Varianten durch die Applikation von Atropin verringert werden konnte. So lag bei der Variante f-MKKFR eine Reduktion um ~86,6 % ( $p=0,0317$ ;  $n=5$ ; Mann-Whitney-U-Test) (Abb. 75E), bei der Variante f-MKKFRY eine Reduktion um ~75,4 % ( $p=0,0411$ ;  $n=6$ ; Mann-Whitney-U-Test) (Abb. 75F) und bei der Variante f-MKKFKWSI eine Reduktion um ~76,3 % vor ( $p=0,0043$ ;  $n=6$ ; Mann-Whitney-U-Test) (Abb. 75G) (Appendix Tab. 45).

Aus diesen Versuchen lässt sich schlussfolgern, dass muskarinische ACh-Rezeptoren, im Besonderen der muskarinische ACh-Rezeptor M3, an der Erhöhung der PTS durch f-MKKFRW beteiligt sind.



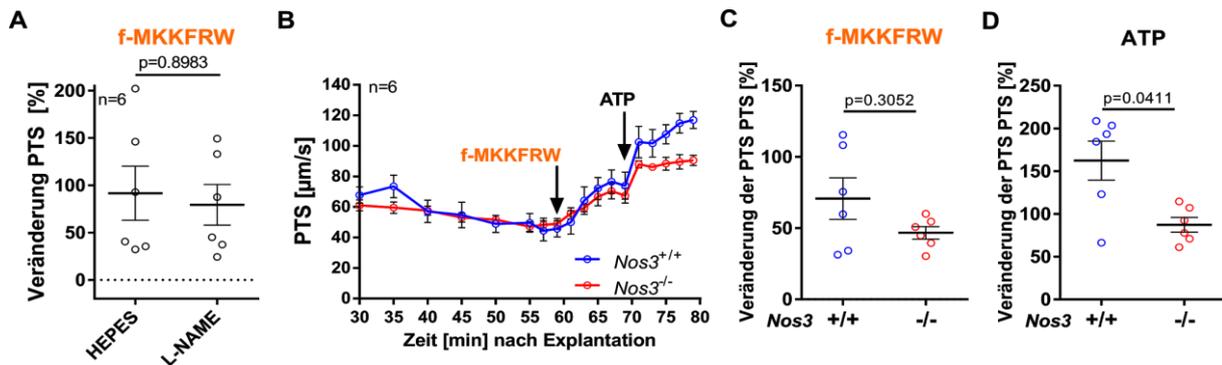
**Abbildung 75: Veränderung der PTS durch f-MKKFRW und dessen Varianten in Abhängigkeit von muskarinischen ACh-Rezeptoren.** A-G: Dargestellt ist die prozentuale Veränderung der PTS 8 min nach Gabe von formylierten Peptiden oder Muskarin (B) in An- oder Abwesenheit von Inhibitoren der muskarinischen ACh-Rezeptoren oder der Abwesenheit des muskarinischen ACh-Rezeptors M3 (D). **A:** Der prozentuale Anstieg der PTS durch f-MKKFRW ist durch die Gabe von Atropin (1  $\mu$ M) verringert ( $p=0,0055$ ). **B:** Die Applikation von Muskarin (100  $\mu$ M) führt zu einem Anstieg der PTS, welcher durch die Gabe des muskarinischen ACh-Rezeptor-M3-Antagonisten 4-DAMP (1  $\mu$ M) massiv verringert wird ( $p=0,0079$ ). **C:** Der prozentuale Anstieg der PTS durch f-MKKFRW wird durch die Gabe von 4-DAMP ebenfalls stark verringert ( $p=0,0011$ ). **D:** Der prozentuale Anstieg der PTS durch f-MKKFRW ist in Mäusen, welche defizient für den muskarinischen ACh-Rezeptor M3 sind, im Vergleich zu den Kontrolltieren stark verringert ( $p=0,0011$ ). **E:** Der prozentuale Anstieg der PTS durch f-MKKFR wird durch die Gabe von Atropin massiv verringert ( $p=0,0317$ ). **F:** Der prozentuale Anstieg der PTS durch f-MKKFRY wird durch die Gabe von Atropin stark verringert ( $p=0,0411$ ). **G:** Der prozentuale Anstieg der PTS durch f-MKKFKWSI wird durch die Gabe von Atropin massiv verringert ( $p=0,0043$ ). A-G: Mittelwert  $\pm$  SEM, Mann-Whitney-U-Test. **A, C, E, F, G:** Modifiziert aus Perniss et al. 2020b.

### 3.7 Abhängigkeit der Erhöhung der PTS durch f-MKKFRW von NO

Es ist bekannt, dass der Gasotransmitter Stickstoffmonoxid (NO) die Zilienschlagfrequenz von zilienträgenden Zellen des Nasenepithels erhöhen kann. Dies wurde sowohl für Epithelzellen von Mäusen als auch für humane Nasenepithelzellen gezeigt (Carey et al. 2017; Lee et al. 2014). Als Stimulus dabei dienen bakterielle Produkte, z.B. QSM von *Pseudomonas aeruginosa*, oder die Applikation von Bakterien (*Bacillus cereus*) an sich. In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass NO ebenso die Schlagfrequenz von murinen trachealen zilienträgenden Zellen erhöht. Dieser Effekt war jedoch in murinen nasalen Epithelzellen ausgeprägter. Als Stimulus diente in dieser Studie L-Arginin, welches wiederum durch die Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) in L-Citrullin umgesetzt wird. Dabei kommt es zu einer Freisetzung von NO. Zudem konnte gezeigt werden, dass diejenige endotheliale NOS (eNOS) die NOS-Isoform darstellt, welche im Atemwegsepithel für die Freisetzung von NO verantwortlich ist (Jiao et al. 2011).

Um zu untersuchen, ob der Gasotransmitter NO an der Erhöhung der PTS durch f-MKKFRW beteiligt ist, wurden Versuche mit dem generellen NOS-Inhibitor L-NAME (NG-Nitro-L-Argininmethylester) durchgeführt (Rees et al. 1990). Dabei hatte die Applikation von L-NAME keinen Einfluss auf die durch f-MKKFRW induzierte Steigerung der PTS. Diese betrug ohne die Gabe von L-NAME  $92 \pm 29\%$  und mit Applikation von L-NAME  $79 \pm 21\%$  ( $p=0,8983$ ;  $n=6$ ; Mann-Whitney-U-Test) (Abb. 76A) (Appendix Tab. 47). Zudem erfolgten Experimente an Mäusen, welche eine Defizienz der eNOS aufwiesen (*Nos3<sup>-/-</sup>*). Diese Mäuse wurden von Herrn Prof. Dr. Axel Gödecke, Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, zur Verfügung gestellt. Als Kontrolltiere wurden homozygote Wt verwendet (Wurfgeschwister, *Nos3<sup>+/+</sup>*). Die Applikation von f-MKKFRW führte in beiden Genotypen zu einem Anstieg der PTS. So stieg die PTS in *Nos3<sup>+/+</sup>*-Tieren von  $46 \pm 5$  auf  $76 \pm 8$   $\mu\text{m/s}$  und in *Nos3<sup>-/-</sup>*-Tieren von  $48 \pm 5$  auf  $71 \pm 5$   $\mu\text{m/s}$  an ( $p=0,0313$  und  $p=0,0313$ ;  $n=6$ ; Wilcoxon-Rangsummentest) (Abb. 76B) (Appendix Tab. 48). Die prozentualen Anstiege durch f-MKKFRW unterschieden sich ebenfalls nicht signifikant voneinander ( $70,7 \pm 15\%$  und  $47 \pm 5\%$ ;  $p=0,3052$ ; Mann-Whitney-U-Test) (Abb. 76C), jedoch führte die darauffolgende Applikation von ATP in *Nos3<sup>-/-</sup>*-Tieren zu einem geringeren Anstieg der PTS im Vergleich zu dem beobachteten Anstieg in den Kontrolltieren ( $87 \pm 9\%$  und  $162 \pm 23\%$ ;  $p=0,0411$ ; Mann-Whitney-U-Test) (Abb. 76B und D).

Die Ergebnisse dieser Versuche legen nahe, dass der Gasotransmitter NO nicht in die Erhöhung der PTS durch f-MKKFRW involviert ist.



**Abbildung 76: Veränderung der PTS durch f-MKKFRW in Abhängigkeit des Gasotransmitters NO.** **A:** Dargestellt ist die prozentuale Veränderung der PTS durch die Gabe von f-MKKFRW (10  $\mu\text{M}$ ) in An- oder Abwesenheit des generellen NOS Inhibitors L-NAME (20  $\mu\text{M}$ ). Dieser hat keinen Einfluss auf die Erhöhung der PTS durch f-MKKFRW ( $p=0,8963$ ). **B:** Dargestellt ist der Kurvenverlauf der PTS-Experimente an Mäusen mit Defizienz der endothelialen NO-Synthase ( $Nos3^{-/-}$ ) und Kontrolltieren ( $Nos3^{+/+}$ , Wurfgeschwister). f-MKKFRW und ATP führen in beiden Genotypen zu einem Anstieg der PTS. **C und D:** Dargestellt ist die prozentuale Veränderung der PTS 8 min nach Gabe von f-MKKFRW (10  $\mu\text{M}$ ) (C) oder ATP (C), der in B dargestellten Experimente. **C:** Der durch f-MKKFRW verursachte Anstieg der PTS unterscheidet sich nicht zwischen den beiden Genotypen ( $p=0,3052$ ). **D:** Der Anstieg der PTS durch ATP ist in  $Nos3^{-/-}$ -Tieren verringert im Vergleich zu dem in Kontrolltieren ( $p=0,0411$ ). A, C, D: Mittelwert  $\pm$  SEM, Mann-Whitney-U-Test. **A, C, D:** Modifiziert aus Perniss et al. 2020b.

### 3.8 Beteiligung sensorischer Nervenfasern an der Erhöhung der PTS durch f-MMKFRW

Im Epithel der Trachea sind sensorische Nervenfasern zu finden. Diese afferenten Nervenfasern enden entweder subepithelial oder direkt im Trachealepithel. Wie in Abb. 34 und 36 bereits dargestellt, sind diese Nervenfasern teilweise PGP9.5-positiv. Zudem sind Subpopulationen der Nervenfasern immunreaktiv für das Neuropeptid CGRP (Abb. 37) (Krasteva et al. 2011). In der Arbeit von Krasteva und KollegInnen konnte gezeigt werden, dass 21 % der ChAT-positiven SCCC in direktem Kontakt zu PGP9.5-positiven Nervenfasern stehen. Zudem waren 5.8 % der SCCC in direktem Kontakt zu peptidergen CGRP-positiven Nervenfasern (Krasteva et al. 2011). Des Weiteren sind auch SP-positive Nervenfasern im Trachealepithel vorhanden (Maus: Xiao und Wu 2012; Mazzone und McGovern 2008; Meerschweinchen: Mazzone und McGovern 2008). Ob diese in Kontakt zu SCCC stehen, wurde jedoch noch nicht untersucht. Die peptidergen Nervenfasern können nach Stimulation das Neuropeptid CGRP und/oder SP lokal freisetzen, was wiederum zu dem Phänomen der lokalen neurogenen Entzündung führen kann. Die Zellkörper dieser sensorischen Neurone sind im JNC lokalisiert (Maus: Krasteva et al. 2011; Meerschweinchen: Mazzone et al. 2009) und exprimieren zu einer hohen Prozentzahl die nikotinische ACh-Rezeptor Untereinheit  $\alpha 3$

(Ratte: Mao et al. 2006; Maus: Krasteva et al. 2011). In den nachfolgenden Versuchen sollte untersucht werden, ob f-MKKFRW eine direkte Wirkung auf sensorische Nervenfasern hat. Hierzu wurden zum einen Neurone aus dem JNC von *Chrna3*-GFP-Mäusen isoliert und Messungen der  $[Ca^{2+}]_i$  durchgeführt. Zum anderen erfolgten PTS-Experimente mit den Neuropeptiden SP und CGRP.

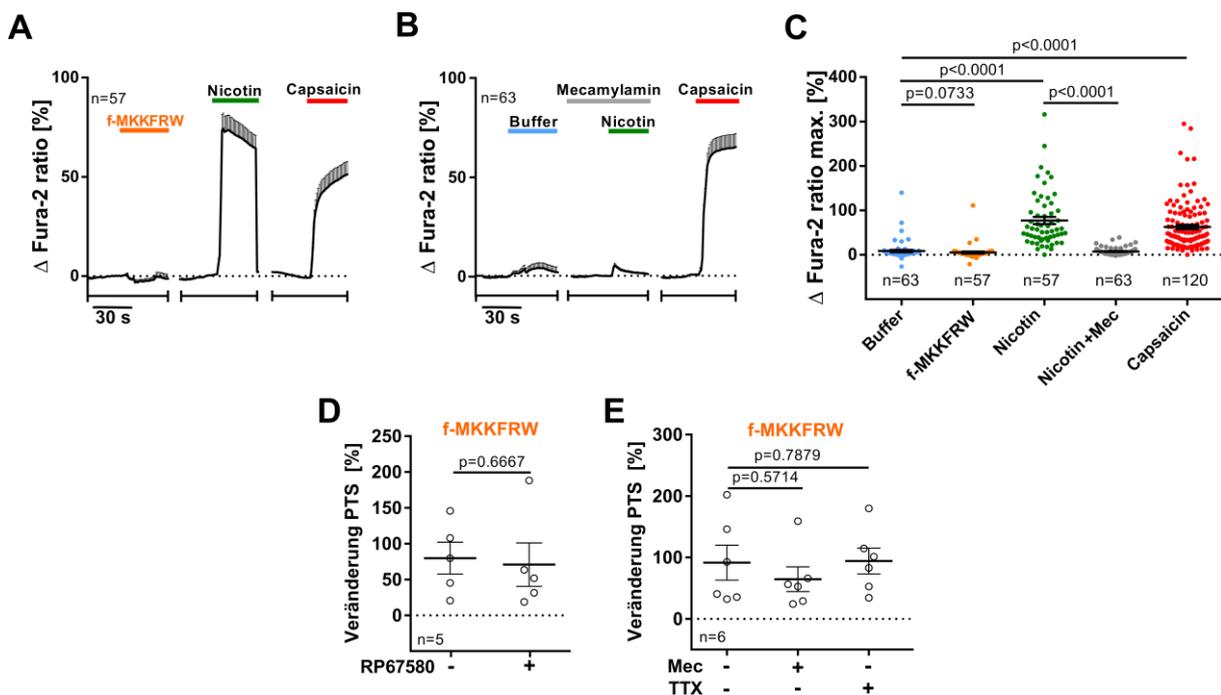
Dabei zeigte sich, dass die Applikation von f-MKKFRW (10  $\mu$ M) zu keiner Änderung der  $[Ca^{2+}]_i$  in isolierten Neuronen führte. So änderte sich die  $[Ca^{2+}]_i$  nach Applikation der Kontrollsubstanz (500  $\mu$ L Puffer) nur um  $8,5 \pm 2,7$  % (n=63; 7 Deckgläschen; 6 Tiere; 2 unabhängige Experimente). Die Gabe von f-MKKFRW führte zu einem Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  von  $5 \pm 2,2$  % (n=57; 8 Deckgläschen; 6 Tiere; 2 unabhängige Experimente). Die Anstiege der  $[Ca^{2+}]_i$  unterschieden sich nicht signifikant voneinander (p=0,0733; Mann-Whitney-U-Test) (Abb. 77B und C). Dagegen führte die Applikation von Nikotin (100  $\mu$ M) zu einem Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  um  $77,2 \pm 8$  % (p<0.0001; Mann-Whitney-U-Test) (n=57; 6 Deckgläschen; 6 Tiere; 2 unabhängige Experimente) (Abb. 77A und C). Dieser Anstieg konnte durch die Gabe von Mecamylamin (100  $\mu$ M) verhindert werden. Nach Applikation von Mecamylamin und darauffolgender Gabe von Nikotin stieg die  $[Ca^{2+}]_i$  nur noch um  $7,4 \pm 1$  % an (p<0.0001; Mann-Whitney-U-Test) (n=63; 7 Deckgläschen; 6 Tiere; 2 unabhängige Experimente) (Abb. 77B und C). Die Applikation des TRPV1-Agonisten Capsaicin (300 nM) führte ebenfalls zu einem Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  um  $62,7 \pm 4,9$  % (p<0.0001; Mann-Whitney-U-Test) (n=120; 13 Deckgläschen; 6 Tiere; 2 unabhängige Experimente) (Abb. 77A - C). TRPV1 wird von einem Großteil der Neurone im JNC der Maus exprimiert (Kim et al. 2020).

Die Applikation von CGRP (10 nM - 10  $\mu$ M) führte zu keiner Veränderung der PTS. Diese Versuche wurden von Frau Öznur Aydin am Institut für Anatomie und Zellbiologie durchgeführt (Perniss et al. 2020b). Dagegen führte die Applikation des SP-Analogons Sar<sup>9</sup>-Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>-SP (10 nM) zu einem Anstieg der PTS, welcher durch die Gabe des TACR1-Inhibitors RP67580 verhindert werden konnte. Diese Versuche wurden ebenfalls von Frau Aydin durchgeführt (Perniss et al. 2020b). Um zu untersuchen, ob f-MKKFRW zu einer Freisetzung von SP aus Nervenfasern führt, welches wiederum zu einer Steigerung der PTS führen würde, erfolgte die Applikation des TACR1-Inhibitors RP67580 (10  $\mu$ M) bevor f-MKKFRW gegeben wurde. Jedoch konnte kein Unterschied in der PTS Steigerung durch f-MKKFRW mit oder ohne RP67580 Gabe (10  $\mu$ M) festgestellt werden ( $79,7 \pm 22,2$  zu  $70,7 \pm 30,4$ %; n= 5; p=0,6667; Mann-Whitney-U-Test) (Abb. 77D) (Appendix Tab. 49).

Um zu untersuchen, ob nikotinische ACh-Rezeptoren, welche von den sensorischen Nervenfasern exprimiert werden, an der PTS-stimulierenden Wirkung von f-MKKFRW beteiligt sind, erfolgte die Applikation von Mecamylamin (100  $\mu$ M). Auch hier konnte kein Unterschied zu der Kontrolle ohne Mecamylamin festgestellt werden. So betrug der Anstieg der PTS ohne

Inhibitor  $91,5 \pm 28,6$  % und mit Mecamylamin  $64,6 \pm 20$  % ( $p=0,5714$ ;  $n=6$ ; Mann-Whitney-U-Test) (Abb. 77E) (Appendix Tab. 50).

Um zu untersuchen, ob eine Erregungsweiterleitung in Nervenfasern eine Rolle spielt, wurde diese durch den Einsatz von Tetrodotoxin (TTX) inhibiert. TTX hemmt spannungsabhängige Natriumkanäle ( $Na_v$ -Kanäle), welche in der Mehrzahl der Axone für die Erregungsweiterleitung essentiell sind (Baker und Glitsch 1975). Die Gabe von TTX ( $1 \mu\text{M}$ ) führte jedoch zu keiner Reduktion der PTS-Steigerung durch f-MKKFRW ( $91,5 \pm 28,6$  zu  $79,4 \pm 24,2$  %;  $p=0,8983$ ;  $n=6$ ; Mann-Whitney-U-Test) (Abb. 77E) (Appendix Tab. 50).



**Abbildung 77: Beteiligung sensorischer Nervenfasern an der Erhöhung der PTS durch f-MKKFRW.** **A-B:** Dargestellt sind die  $\Delta$ Fura-2 Ratios von isolierten Neuronen des JNC aus *Chrna3*-GFP-Mäusen. **A:** Die Applikation von Nikotin ( $100 \mu\text{M}$ ) und Capsaicin ( $300 \text{ nM}$ ) führt zu einem Anstieg der Fura-2-Ratio. Die Applikation von f-MKKFRW ( $10 \mu\text{M}$ ) hat keinen Einfluss auf die Fura-2-Ratio (57 Neurone von 6 Mäusen, 8 *Coverslips*, 2 unabhängige Experimente). **B:** Die Applikation von Mecamylamin ( $100 \mu\text{M}$ ) verhindert den Anstieg der Fura-2-Ratio (63 Neurone von 6 Mäusen auf 7 *Coverslips*, 2 unabhängige Experimente). **C:** Auswertung der in A und B dargestellten Experimente. **D:** Dargestellt ist die prozentuale Veränderung der PTS durch die Gabe von f-MKKFRW in An- oder Abwesenheit des TACR1-Inhibitors RP67580 ( $10 \mu\text{M}$ ). Dieser hat keinen Einfluss auf die Erhöhung der PTS durch f-MKKFRW ( $p=0,6667$ ). **E:** Die Kontrollen ohne Inhibitor entsprechen den Versuchen, welche bereits in Abb. 76A gezeigt wurden. Diese Versuche fanden in einem gemeinsamen experimentellen Aufbau statt. Das bedeutet, an einem Tag wurden verschiedene Mäuse mit oder ohne Inhibitoren untersucht. Der generelle nAChR-Inhibitor Mecamylamin ( $100 \mu\text{M}$ ) hatte keinen Einfluss auf die PTS-steigernde Wirkung von f-MKKFRW ( $p=0,5714$ ), der  $Na_v$ -Kanal-Inhibitor TTX ( $1 \mu\text{M}$ ) hatte ebenso keinen Einfluss auf die PTS-steigernde Wirkung von f-MKKFRW ( $p=0,7879$ ). C-E: Mittelwert  $\pm$  SEM, Mann-Whitney-U-Test. Modifiziert aus Perniss et al. 2020b.

Aus diesen Versuchen lässt sich schlussfolgern, dass sensorische Nervenfasern vermutlich nicht an der Erhöhung der PTS durch das Signalpeptid f-MKKFRW beteiligt sind.

### **3.9 Relevanz der SCCC für die bakterielle Besiedlung der Trachea und Lunge**

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass die Anzahl der SCCC in der Trachea unabhängig von der lebenden Mikrobiota der Tiere ist, jedoch die Unterbrechung des TLR-Signalweges zu einer verringerten Anzahl der SCCC in der Trachea führt. Zudem konnte gezeigt werden, dass bakterielle Signalpeptide mit der Kernaminosäuresequenz f-MKKFR von SCCC erkannt werden, diese ACh freisetzen, was wiederum zu einer Erhöhung der MC führt. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass SCCC an der Erkennung von Bakterien beteiligt sind oder deren Anzahl durch diese beeinflusst wird. Es wäre daher möglich, dass ein Fehlen der SCCC oder die Unterbrechung eines Signalweges innerhalb der SCCC zu einer veränderten Besiedlung des respiratorischen Systems durch Bakterien oder zu einer erhöhten Infektanfälligkeit der Tiere führen könnte.

Um dies zu untersuchen, wurden zunächst PTS-Experimente mit Überständen von MgrB überexprimierenden *E. coli* durchgeführt. Diese Experimente hatten das Ziel festzustellen, ob bakterielle Überstände einen Einfluss auf die PTS haben und ob dieser abhängig von SCCC ist. In einem weiteren Versuch wurde untersucht, ob Mäuse, welche eine Defizienz des TRPM5-Ionenkanals besitzen, eine höhere Anfälligkeit aufweisen, von dem Bakterium *Bordetella pseudohinzii* kolonisiert zu werden. In einem weiteren Experiment sollte unter Verwendung eines Infektionsmodelles (*S. pneumoniae*) untersucht werden, ob sich Tiere, die keine SCCC besitzen (*Trpm5*-DTA), von den Kontrolltieren in Bezug auf die Überlebensrate und Überlebenszeit, Anzahl der Bakterien und histologischen Veränderungen unterscheiden.

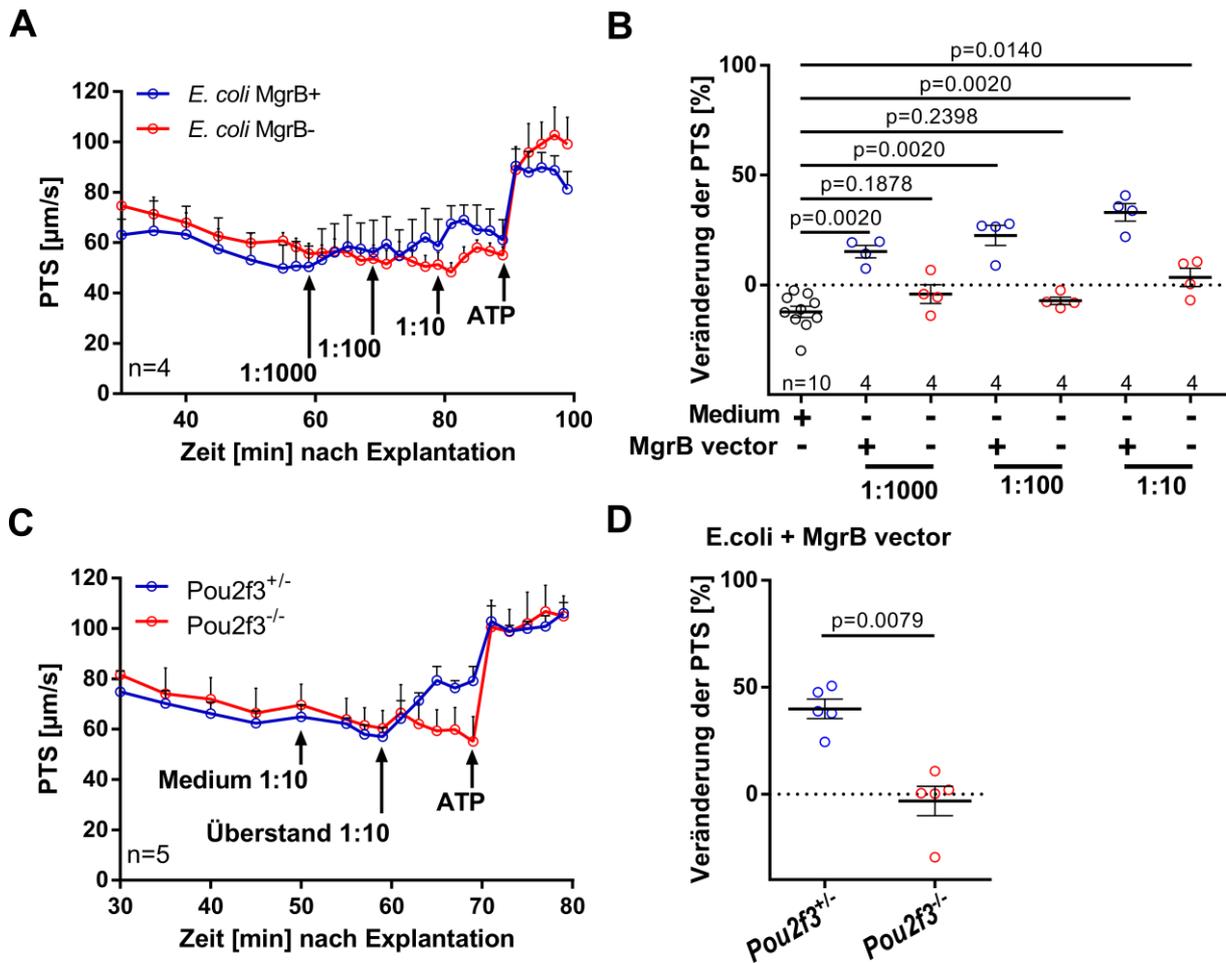
#### **3.9.1 Einfluss von bakteriellen Überständen von MgrB-überexprimierenden *E. coli* auf die PTS**

Das zuvor beschriebene Signalpeptid f-MKKFRW ist am N-Terminus des MgrB-Proteins vorhanden (Bufe et al. 2019). Verschiedene *E. coli* Stämme exprimieren ebenfalls das MgrB-Protein, z.B. typische Laborstämme, wie BL21 oder K12. In der Arbeit von Prof. Bufe und KollegInnen konnte gezeigt werden, dass MgrB auch in Überständen von *E. coli* vorhanden ist, welche das *mgrb*-Gen überexprimieren (Bufe et al. 2019). Diese steril filtrierte Überstände wurden uns von Herrn Bufe zur Verfügung gestellt. Als Kontrolle diente zum einen das Kultivierungsmedium und Überstände von *E. coli* (BL21), welche das MgrB-Protein nicht überexprimieren. Die Applikation des Mediums in einer Verdünnung von 1:10 führte zu keiner Erhöhung der PTS, im Gegenteil, die PTS verringerte sich um  $12,3 \pm 3 \%$  ( $p=0,0020$ ;  $n=10$ ; Wilcoxon-Rangsummentest) (Abb. 78B und C). Dagegen führte bereits die Applikation des

Überstandes der MgrB-überexprimierenden *E. coli* in einer Verdünnung von 1:1000 zu einer Erhöhung der PTS um  $15,1 \pm 3 \%$  ( $p=0,0020$ ), die Applikation des Überstandes in einer Verdünnung von 1:100 steigerte die PTS um  $22,5 \pm 5 \%$  ( $p=0,0020$ ) und die Gabe des Überstandes in einer Verdünnung von 1:10 steigerte die PTS um  $33 \pm 4\%$  ( $p=0,0020$ ) (jeweils im Vergleich zu der Applikation des Mediums in einer Verdünnung von 1:10;  $n=4$  je Verdünnung; Mann-Whitney-U-Test) (Abb. 78A und B).

Die Applikation des Überstandes der nicht MgrB-überexprimierenden Bakterien führte nur in der Verdünnung 1:10 zu einem geringen Anstieg der PTS um  $3,5 \pm 4\%$  ( $p=0,0140$ ) (Abb. 78A und B) (Appendix Tab. 51). In einem weiteren Experiment wurde untersucht, ob der Anstieg der PTS, verursacht durch den Überstand der MgrB-überexprimierenden Bakterien, von SCCC abhängig ist. Hierzu wurde der Überstand in einer Verdünnung von 1:10 auf Tracheen von *Pou2f3<sup>-/-</sup>*- und *Pou2f3<sup>+/-</sup>*-Tieren appliziert. Nur in Tracheen von *Pou2f3<sup>+/-</sup>*-Tieren führte dies zu einer Erhöhung der PTS um  $39,9 \pm 5 \%$ , in Tracheen von *Pou2f3<sup>-/-</sup>*-Tieren verringerte sich die PTS dagegen um  $3 \pm 7\%$  ( $p=0,0079$ ;  $n=5$ ; Mann-Whitney-U-Test) (Abb. 78C und D) (Appendix Tab. 52).

Aus diesen Versuchen lässt sich zusammenfassen, dass die Überstände von MgrB-überexprimierenden *E. coli* zu einem Anstieg der PTS führten und dass dieser abhängig von SCCC war. Zudem führte aber auch eine geringe Verdünnung der Überstände der nicht MgrB-überexprimierenden *E. coli* zu einem schwachen Anstieg der PTS. Ob dieser von SCCC abhängig ist, wurde jedoch nicht untersucht.

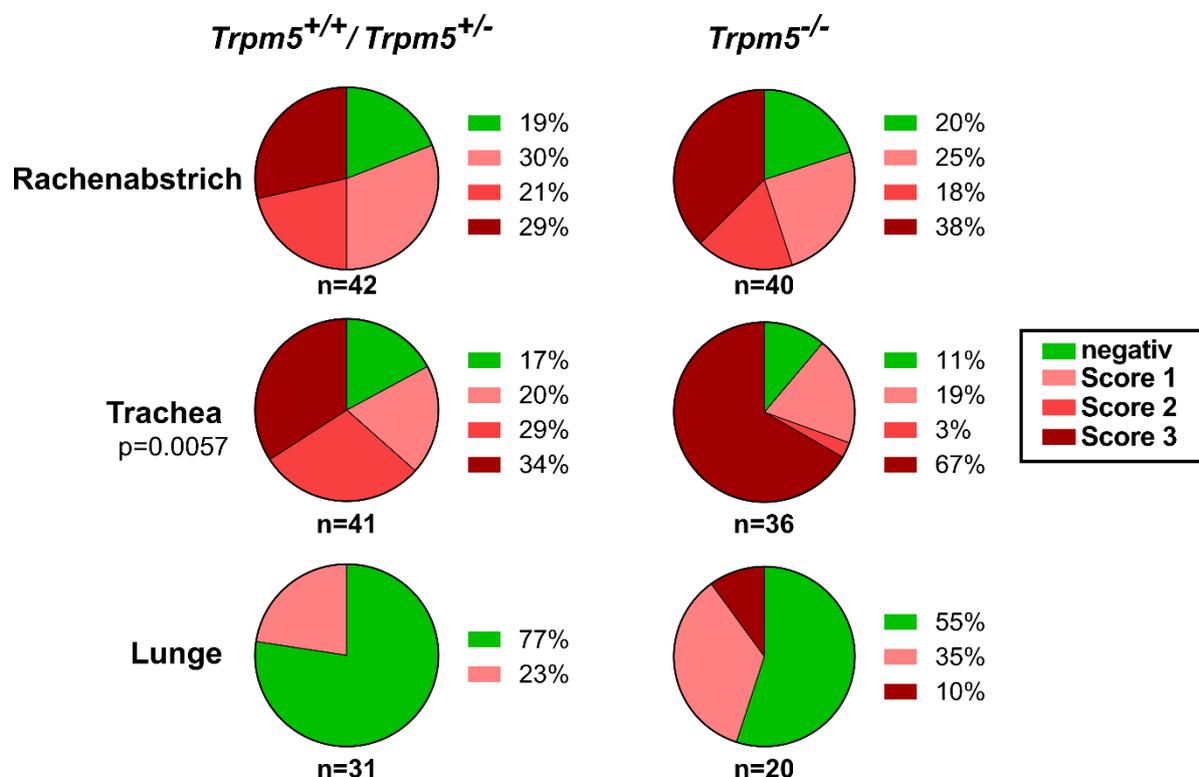


**Abbildung 78: Veränderung der PTS durch Überstände von MgrB-überexprimierenden *E. coli* in Abhängigkeit von SCCC.** **A:** Dargestellt ist der Kurvenverlauf der PTS-Experimente mit bakteriellen Überständen (in verschiedenen Konzentrationen) von *E. coli* (BL21), welche entweder das Protein MgrB überexprimieren oder nicht. **B:** Auswertung der in A dargestellten Experimente. Prozentuale Veränderung der PTS 8 min nach Gabe der bakteriellen Überstände. Die Gabe von Medium (1:10) ist in C dargestellt. Die Überstände der MgrB-überexprimierenden *E. coli* führen in allen eingesetzten Verdünnungen zu einem Anstieg der PTS. Nur die Verdünnung 1:10 der nicht MgrB-überexprimierenden *E. coli* führt zu einem geringen Anstieg der PTS ( $p=0,0140$ ). **C:** Dargestellt ist der Kurvenverlauf der PTS-Experimente mit bakteriellen Überständen von MgrB-überexprimierenden *E. coli* (BL21) (1:10 Verdünnung) an Tracheen von  $Pou2f3^{+/-}$  und  $Pou2f3^{-/-}$ -Mäusen. **D:** Auswertung der in C dargestellten Experimente. Prozentuale Veränderung der PTS (8 min nach Gabe), die Überstände der MgrB-überexprimierenden *E. coli* führt nur in Tracheen von  $Pou2f3^{-/-}$ -Mäusen zu einem Anstieg der PTS ( $p=0,0079$ ). A, C: Mittelwert + SEM. B, D: Mittelwert  $\pm$  SEM; Mann-Whitney-U-Test. B, D: Modifiziert aus Perniss et al. 2020b.

### 3.9.2 Relevanz des Ionenkanals TRPM5 für die Besiedlung des respiratorischen Systems durch *Bordetella pseudohinzii*

Ab Herbst 2016 kam es vermehrt dazu, dass PTS-Experimente Auffälligkeiten in der Grundgeschwindigkeit (*Baseline*) der Partikel und auch in der Stimulierbarkeit durch ATP aufwiesen. Im Zuge dessen wurden Proben dieser Tiere für eine mikrobielle Analyse an das Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere der JLU übergeben. Aus diesen Proben wurde unter anderem das Bakterium *Bordetella pseudohinzii* isoliert. Dieses Bakterium wird nicht in der Liste der Pathogene aufgeführt, welche aus der Tierhaltung eliminiert werden sollten (*Federation of European Laboratory Animal Science Association* - FELASA Liste) (Pritchett-Corning et al. 20). Es zeigte sich, dass 93% (78 von 84) der untersuchten Tiere mit *B. pseudohinzii* infiziert waren (Perniss et al. 2018). Dies betraf jedoch nur einen Teil der Tierhaltung, sodass im Laufe der Zeit alle Mauslinien in *B. pseudohinzii*-freie Tierhaltungen mittels Embryotransfer überführt werden konnten. Weitere Untersuchungen, welche im Rahmen einer genauen Charakterisierung der durch *B. pseudohinzii* verursachten pathologischen Veränderungen durchgeführt wurden, zeigten, dass Tiere, welche mit *B. pseudohinzii* infiziert waren, eine geringere PTS-*Baseline*, eine geringere Steigerung der PTS durch ATP, eine Neutrophilie in der BAL (bronchoalveoläre Lavage) und eine verringerte Anzahl an zilienträgenden Zellen in der Trachea aufwiesen (Perniss et al. 2018). Zudem konnten histologische Veränderungen in der Trachea und Lunge nachgewiesen werden. So konnte eine Entzündung der Trachealschleimhaut, eine bronchointerstitielle Pneumonie und die Bildung von Bronchus-assoziiertem lymphatischem Gewebe beobachtet werden (Perniss et al. 2018). Von diesem Infektionsgeschehen war auch die Haltung der *Trpm5*-Ko Mauslinie betroffen. Im Rahmen der mikrobiellen Untersuchungen wurden insgesamt 82 Tiere dieser Linie positiv auf *B. pseudohinzii* getestet (39 Tiere *Trpm5*<sup>+/+</sup>, 3 Tiere *Trpm5*<sup>+/-</sup> und 40 Tiere *Trpm5*<sup>-/-</sup>). Diese Tiere wurden alle in einem Halterungsraum gehalten, Wurfgeschwister wurden getrennt nach Geschlechtern, aber unabhängig vom Genotyp zusammen in Käfigen gehalten. Untersucht wurden nur adulte Tiere von beiden Geschlechtern in einem Alter von 3-15 Monaten, siehe Tab. Appendix 53. Es erfolgte im Anschluss eine semiquantitative Analyse der Besiedlung dieser Tiere durch Mitarbeiter des Institutes für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere. Dabei wurde untersucht, wie viele Bakterien, insbesondere *B. pseudohinzii*, in der Maulhöhle bzw. Rachen (Rachenabstrich), Trachea und Lunge der Tiere vorhanden waren. Die Untersuchungen wurden verblindet durchgeführt, sodass die Mitarbeiter nicht in Kenntnis über den Genotyp des Versuchstieres waren. Dabei wurde ein Scoring-System angewandt. Ein Score von 0 (negativ) bedeutete, dass *B. pseudohinzii* nicht nachgewiesen werden konnte; ein Score von 1, dass 5-50 Kolonien pro Probe nachgewiesen wurden, ein Score von 2 entsprach 50-200 Kolonien und ein Score von 3 entsprach >200 Kolonien pro Probe.

Dabei zeigte sich ein Unterschied in der Besiedlung der unterschiedlichen Genotypen. Es konnte in allen drei untersuchten Lokalisationen ein Trend zu einer stärkeren Besiedlung der *Trpm5*<sup>-/-</sup>-Tiere beobachtet werden. So wurde im Rachenabstrich in 38% der *Trpm5*<sup>-/-</sup>-Tiere (15/39) ein Score von 3 festgestellt, dagegen in den Kontrolltieren (*Trpm5*<sup>+/-</sup> und *Trpm5*<sup>+/+</sup>) nur in 29% der Tiere (12/42) (Abb. 79). Größer war der beobachtete Unterschied der Besiedlung der Trachea mit *B. pseudohinzii*. Hier konnte ein signifikanter Unterschied beobachtet werden ( $p=0,0057$ ; Chi-Quadrat-Test). In der Trachea wiesen 67 % der *Trpm5*<sup>-/-</sup>-Tiere (24/36) einen Score von 3 auf, dagegen nur 34 % der Kontrolltiere (14/41) (Abb. 79). In 45% (9/20) der untersuchten Lungenproben der *Trpm5*<sup>-/-</sup>-Tiere konnte *B. pseudohinzii* nachgewiesen werden, dagegen nur in 23% (7/31) der Kontrolltiere (Abb. 79).



**Abbildung 79: Semiquantitative Auswertung der Kolonisation mit *B. pseudohinzii* in *Trpm5*-Ko- und Kontrolltieren.** Proben von *Trpm5*<sup>-/-</sup>-Tieren und Kontrolltieren (*Trpm5*<sup>+/+</sup> und <sup>+/-</sup>) wurden auf das Vorhandensein und die Anzahl von *B. pseudohinzii* hin untersucht. Dazu wurde ein Scoring-System verwendet (Score 1 = 5-50 CFU pro Probe; Score 2 = 50-200 CFU; Score 3 >200 CFU). Dabei zeigte sich in der Besiedlung der Trachea ein signifikanter Unterschied zwischen den Ko-Tieren und den Kontrolltieren ( $p=0,0057$ ; Chi-Quadrat-Test). Modifiziert aus Perniss et al. 2020b.

Aus diesen Versuchen lässt sich schlussfolgern, dass der Verlust des Ionenkanals TRPM5 zu einer erhöhten Anzahl des Bakteriums *B. pseudohinzii* innerhalb des respiratorischen Systems führt. Diese Daten wurden jedoch im Rahmen eines nicht gezielten Infektionsgeschehens erhoben.

### 3.9.3 Relevanz von SCCC für die Besiedlung des respiratorischen Systems durch *S. pn*

Um zu untersuchen, ob SCCC an der Erkennung von *S. pneumoniae* und/oder der nachfolgenden Immunantwort im Zuge einer Infektion durch diese beteiligt sind wurden Infektionsversuche mit diesem typischen Pneumonie-Erreger durchgeführt. Diese erfolgten an der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie der Charité. Die Versuche wurden mit Tieren der Linie *Trpm5*-DTA und Kontrolltieren durchgeführt. Als Kontrolltiere dienten, wie bei den PTS-Versuchen, TRPM5-IRES-CRE (Wt) verpaart mit R26:lacZbPAfloxDTA (*Trpm5*-DTA<sup>+/-</sup>). Die Tiere wurde in Narkose durch Auftropfen einer Bakteriensuspension auf die Nasenlöcher mit  $2,5 \times 10^5$  *S. pneumoniae* (PN36) pro Tier infiziert. Der Versuchsaufbau und die Abbruchkriterien sind im Abschnitt 2.213 erläutert.

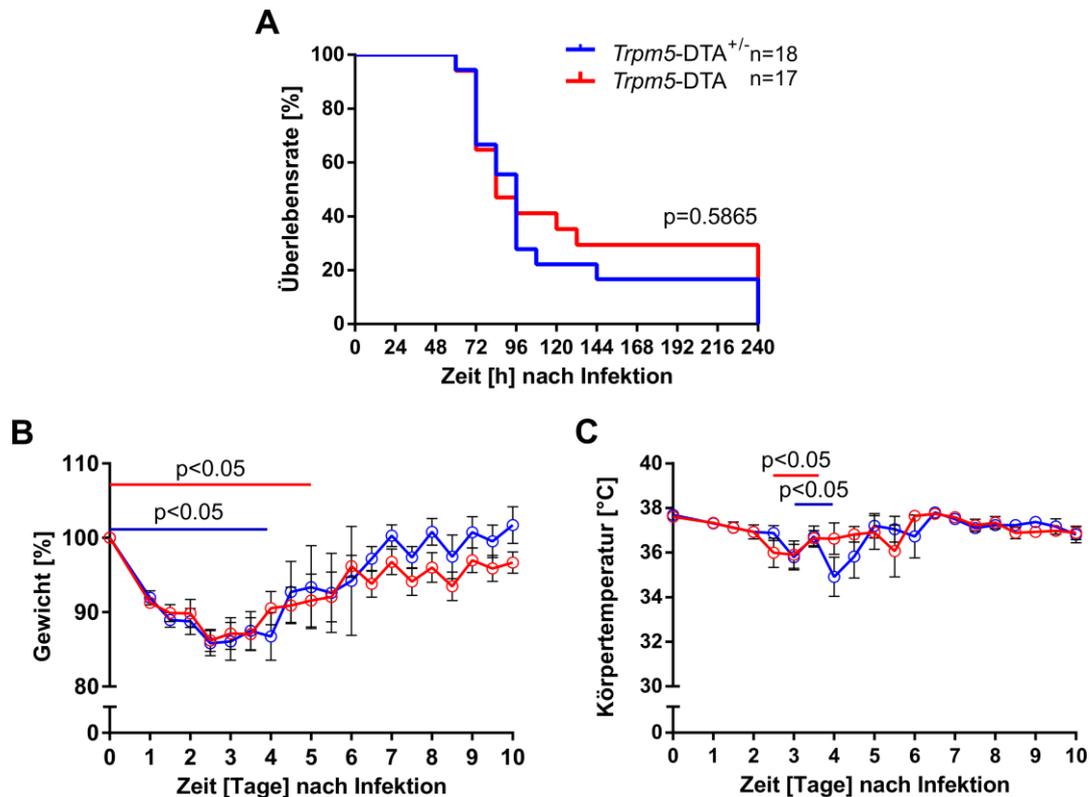
Insgesamt mussten 15 der 18 (83%) Kontrolltiere und 12 der 17 (71%) *Trpm5*-DTA-Tiere innerhalb des Versuchszeitraums aufgrund der festgelegten Endpunkte euthanasiert werden, siehe Tab. 54 Appendix. Vergleicht man die prozentuale Überlebensrate der Tiere, dargestellt in Abb. 80A, so konnte kein Unterschied in den Kaplan-Meier-Kurven zwischen den beiden Genotypen festgestellt werden ( $p=0,5865$ ; Mantel-Cox-Test). So mussten die ersten Tiere bereits 60 h nach Infektion euthanasiert werden, 50 % der Tiere beider Genotypen mussten bereits nach 96 h eingeschläfert werden.

Wie schon in Abb. 49D dargestellt, unterschied sich das Körpergewicht der beiden Versuchsgruppen zu Beginn des Versuches nicht. Das Körpergewicht der Tiere beider Genotypen nahm bereits 24 h nach der Infektion ab (um ~9 % bei den *Trpm5*-DTA- bzw. ~8% bei den Kontrolltieren), bis 60 h nach Infektion verringerte sich das Körpergewicht der Tiere beider Genotypen weiter (jeweils Abnahme um ~14 %). Danach stieg das Körpergewicht wieder an, sodass am Versuchsende das Ausgangsgewicht bei den Kontrolltieren erreicht wurde. Die *Trpm5*-DTA-Tiere wiesen ein Endgewicht von 97% des Ausgangsgewichtes auf. Die Endgewichte beider Genotypen unterschieden sich jedoch nicht ( $p=0.1607$ ;  $n=3-5$ ; Mann-Whitney-U-Test) (Abb.80B).

Die Körpertemperatur nahm im Mittel ebenfalls ab. So lag diese zu Beginn des Versuches bei beiden Genotypen bei ~37,6°C (in Narkose). Diese nahm bis zum 3 Tag bei den *Trpm5*-DTA-Tieren um 1,7 °C und bei den Kontrolltieren bis zum 4 Tag um 2,7 °C ab (Abb. 80C).

Um zu untersuchen, ob eine Bakteriämie der Versuchstiere vorlag, wurde zum Zeitpunkt der Euthanasie sowie nach Beendigung des Versuches (10 Tage) Blut aus der *Vena cava inferior* entnommen und in verschiedenen Verdünnungen auf Columbia Blutagarplatten ausplattiert. Von den insgesamt 35 Versuchstieren konnte bei 27 Tieren erfolgreich Blut entnommen und analysiert werden. Die Tiere, welche nicht euthanasiert werden mussten (drei *Trpm5*-DTA<sup>+/-</sup>

und fünf *Trpm5*-DTA), wiesen keine Bakterien im Blut auf. Dagegen konnten in den restlichen 19 Blutproben (11 *Trpm5*-DTA<sup>+/-</sup> und acht *Trpm5*-DTA) Bakterien in unterschiedlicher Anzahl von 800 bis 7.900.000 CFU/ml nachgewiesen werden, siehe Tab. 54 Appendix. Eine Auswertung, ob ein quantitativer Unterschied in der Bakterienanzahl zwischen den Genotypen oder den untersuchten Zeitpunkten vorlag, konnte leider nicht erfolgen, da die Anzahl der zur Verfügung stehenden Proben dazu zu gering war.



**Abbildung 80: Infektionsexperimente mit *S. pneumoniae* an *Trpm5*-DTA-Tieren. A:** Kaplan-Meier-Kurven der Tiere nach Infektion mit *S. pneumoniae* (PN36),  $2,5 \times 10^5$  pro Tier. Die Kurven unterscheiden sich nicht zwischen den *Trpm5*-DTA- und Kontrolltieren ( $p=0,5865$ ; Mantel-Cox-Test). **B:** Körpergewicht der Tiere des Infektionsversuches dargestellt in A. Das Körpergewicht beider Genotypen nimmt bis zum Tag 4 bei den Kontrolltieren und bis Tag 5 bei *Trpm5*-DTA-Tieren ab ( $p<0,05$ ; jeweils bezogen auf Ausgangsgewicht des jeweiligen Genotyps; One-way-Anova). Das Endgewicht am Tag 10 unterscheidet sich nicht zwischen den Genotypen ( $p=0,1607$ ; Mann-Whitney-U-Test). **C:** Körpertemperatur der Tiere des Infektionsversuches dargestellt in A. Die Körpertemperatur nimmt bei den Kontrolltieren 3-4 Tage und bei den *Trpm5*-DTA-Tieren 2,5-3,5 nach der Infektion ab ( $p<0,05$ ; jeweils bezogen auf die Ausgangstemperatur des jeweiligen Genotyps; One-way-Anova).

### 3.9.3.1 Histologische Veränderungen in der Trachea und Lunge nach Infektion mit *S.*

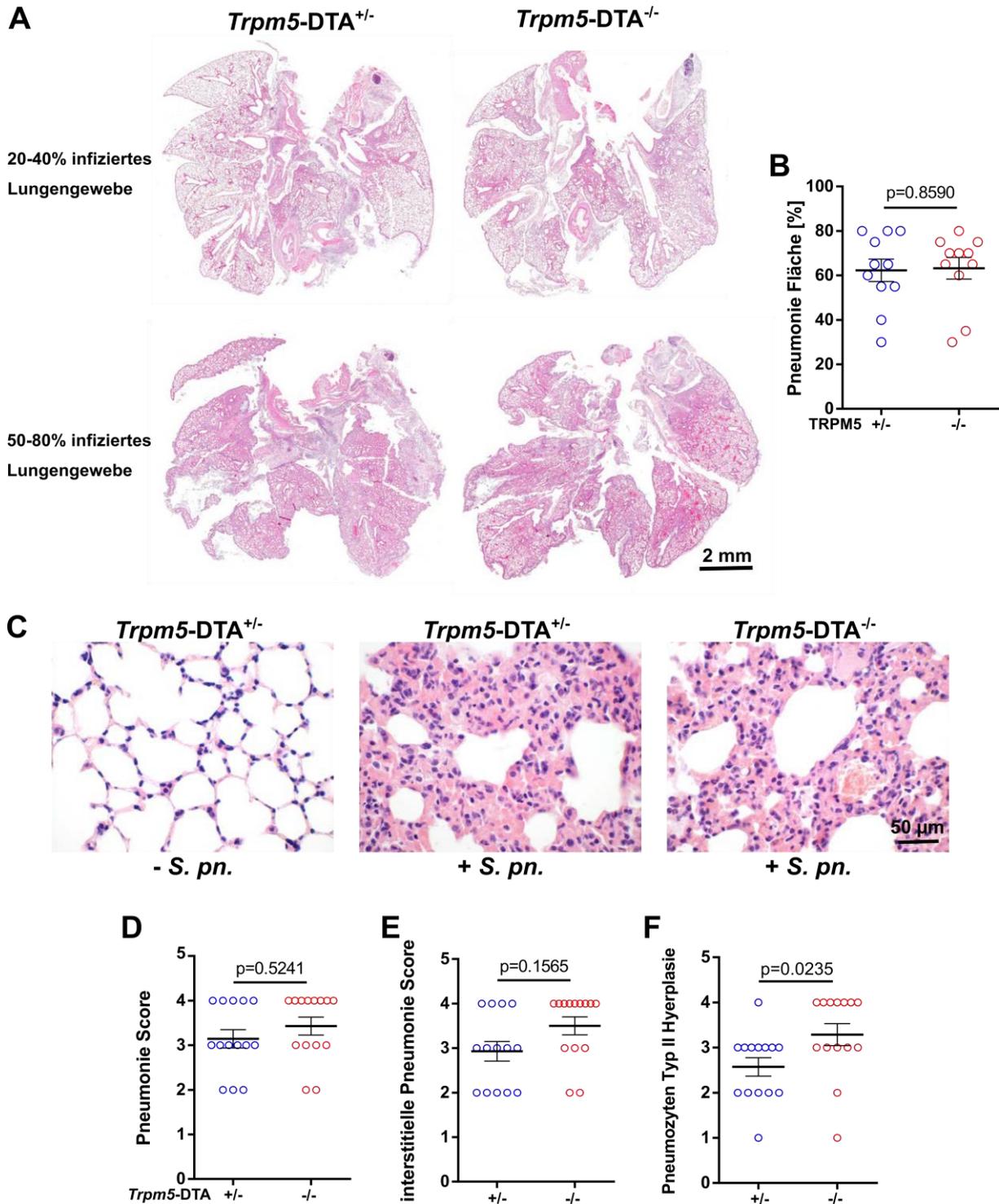
#### *pneumoniae*

In weiteren Untersuchungen wurden die Lungen der mit *S. pneumoniae* infizierten Tiere in Paraffin eingebettet und Serienschnitte hergestellt. Diese wurden anschließend von den Veterinär-Pathologinnen Dr. Kristina Dietert und Dr. Olivia Kershaw vom Institut für Tierpathologie der FU Berlin beurteilt. Es standen für diese Untersuchungen 28 Lungen zur Verfügung, jeweils 14 Lungen von *Trpm5*-DTA- und Kontrolltieren, siehe Tab. 54 Appendix. Im Zuge dessen wurde zum einen untersucht, ob typische Anzeichen einer durch Pneumokokken induzierten Pneumonie vorlagen und ob diese sich in den beiden Genotypen unterschieden. Zusätzlich erfolgte eine Immunmarkierung mit Antikörpern gegen *S. pneumoniae*. Um die Ausprägungen der histologischen Veränderungen und Immunmarkierungen zu beurteilen, wurde ein bereits etabliertes semiquantitatives Scoring angewandt. Dieses wurde wie folgt gegliedert: 0 = nicht vorhanden; 1 = minimal/vereinzelt; 2 = geringgradig; 3 = mittelgradig; 4 = hochgradig; 5 = massiv (Dietert et al. 2014; Dietert et al. 2017). Es wurden ebenfalls Lungen von drei nicht infizierten *Trpm5*-DTA-Tieren untersucht. Dabei konnte kein Unterschied im mikroskopischen Erscheinungsbild und der Histologie im Vergleich zu Wt durch die Pathologen festgestellt werden. In den Lungen beider infizierten Tiergruppen konnten unabhängig vom untersuchten Zeitpunkt typische Lungenveränderungen für eine zeitlich weit fortgeschrittene, durch Pneumokokken induzierte Pneumonie beobachtet werden. So stellten die Tierpathologen in den Lungen der Tiere, welche an früheren Zeitpunkten (60-72 h) euthanasiert werden mussten, eine variabel ausgeprägte, katarrhalisch-eitrig Bronchopneumonie fest. Zu den späteren Zeitpunkten (84-240 h) überwog jedoch eine variabel ausgeprägte vorrangig histozytäre, zum Teil eitrig-nekrotisierende, interstitielle Pneumonie mit teils prominenter Pneumozyten Typ II-Hyperplasie und typischem Ausbreitungsmuster in periphere Lungenareale entlang der großen Gefäße und Bronchien. Zudem konnten in beiden Tiergruppen perivaskuläre sowie alveoläre Ödeme beobachtet werden. Des Weiteren konnte in 21 der 28 untersuchten Lungen eine angrenzende Pleuritis und in 22 der 28 Lungen eine Entzündung des Fettgewebes (Steatitis) festgestellt werden. Ein Unterschied zwischen den beiden Tiergruppen konnten bei diesen untersuchten Parametern nicht festgestellt werden.

Aufgrund der unterschiedlichen Zeitpunkte, an denen die Tiere euthanasiert werden mussten, erfolgte eine Gesamtbeurteilung der Befunde, unabhängig von der Dauer der Infektion.

Als weiterer Parameter wurde die durch die Infektion betroffene Fläche der Lunge bestimmt. Diese war unabhängig von der Überlebensdauer des Versuchstieres. So konnte bereits bei Tieren, welche nach 60 h oder 72 h nach Infektion euthanasiert werden mussten, eine

betroffene Fläche von 80% der Gesamtfläche beobachtet werden, unabhängig vom Genotyp der Tiere (Abb. 81A). Im Mittel unterschied sich die betroffene Fläche der Lunge zwischen den Genotypen nicht (Abb. 81B) ( $p=0,8590$ ;  $n=14$ ; Mann-Whitney-U-Test). Zudem wurde nicht nur die betroffene Fläche beurteilt, sondern auch die Ausprägung der Entzündungsmerkmale. Wie in Abb. 81C dargestellt, kam es nach Infektion zu einer Infiltration von Zellen in das Alveolargewebe, die Alveolarsepten verdickten sich und Flüssigkeit trat in die Alveolen ein. Diese Anzeichen einer Entzündung wurden als allgemeiner Pneumonie-Score zusammengefasst. Dieser unterschied sich ebenfalls nicht zwischen den beiden Genotypen (Abb. 81D) ( $p=0,5241$ ;  $n=14$ ; Chi-Quadrat-Test). Zusätzlich wurde die Art der Pneumonie genauer untersucht. Dabei wurde zwischen einer eitrigen, histozytären, nekrotisierenden, interstitiellen oder katarrhalisch-eitrigen Pneumonie unterschieden. Alle aufgeführten Pneumonieformen konnten in unterschiedlichen Ausprägungen beobachtet werden, wobei die katarrhalisch-eitrige nur in zwei Tieren nachgewiesen werden konnte. Exemplarisch ist in Abb. 81E die Auswertung des Scorings für eine interstitielle Pneumonie dargestellt. Auch hier unterschieden sich die beiden Genotypen nicht voneinander ( $p=0,1565$ ;  $n=14$ ; Chi-Quadrat-Test). Typisch für eine Pneumonie ist zudem die Hyperplasie von Pneumozyten des Typs II, welche ebenfalls in unterschiedlichen Ausprägungen beobachtet werden konnte. In diesem Parameter unterschieden sich die beiden Versuchsgruppen voneinander. In den *Trpm5*-DTA-Tieren konnte eine verstärkte Pneumozyten Typ II-Hyperplasie beobachtet werden (Abb. 81F) ( $p=0,0235$ ;  $n=14$ ; Chi-Quadrat-Test).



**Abbildung 81: Histologische Untersuchungen der Lungen aus den Infektionsversuchen mit *S. pneumoniae* an *Trpm5-DTA*-Tieren. A:** H&E-Färbungen von Lungen nach Infektion mit *S. pneumoniae*. Obere Reihe, Lungen, bei denen 20-40% der Fläche von der Infektion betroffen sind. Untere Reihe, Lungen, bei denen 50-80% der Fläche betroffen sind. Die betroffenen Areale sind an einer intensiveren Färbung des Gewebes zu erkennen, was für eine erhöhte Zelldichte spricht. **B:** Auswertung der in A dargestellten H&E-Färbungen, zwischen den beiden Versuchsgruppen besteht kein Unterschied in der betroffenen Fläche der Lunge ( $p=0,8590$ ;  $n=14$ ; Mann-Whitney-U-Test). **C:** H&E-Färbungen des Alveolarbereichs in höherer Vergrößerung. Links Kontrolle ohne Infektion, daneben Bilder nach Infektion. Es ist eine Zunahme der Zelldichte zu erkennen, eine Abnahme der Alveolargröße, sowie der Kollaps der Alveolen und eine Verdickung der Alveolarsepten. D, E, F: Semiquantitative

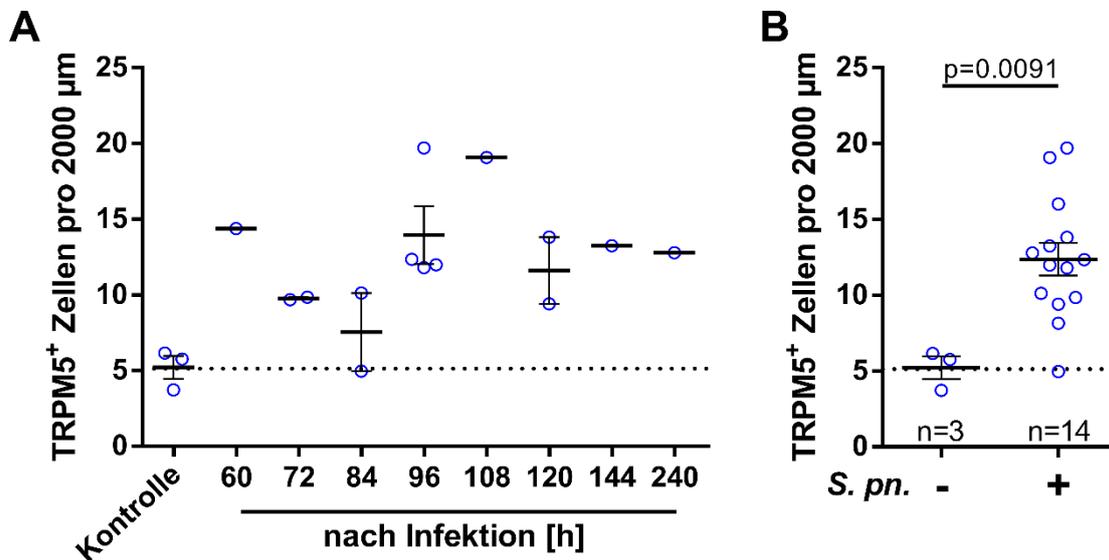
Auswertung der H&E-Färbungen, dargestellt in A. **D**: Die allgemeine Ausprägung der Entzündungszeichen wurde beurteilt (Pneumonie-Score). Dabei konnte kein Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen festgestellt werden ( $p=0,5241$ ; Chi-Quadrat-Test). **E**: Das Vorhandensein einer interstitiellen Pneumonie wurde beurteilt. Dabei konnte kein Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen festgestellt werden ( $p=0,1565$ ; Chi-Quadrat-Test). **F**: Die Zunahme von Pneumozysten Typ II wurde beurteilt. Diese ist in Lungen von *Trpm5*-DTA-Tieren ausgeprägter ( $p=0,0235$ ; Chi-Quadrat-Test). B, D, E, F: jeweils 14 Lungen pro Versuchsgruppe beurteilt.

#### 3.9.3.2 Antikörpermarkierungen mit Antikörpern gegen *S. pneumoniae* in der Lunge

Das Vorhandensein und die Menge an *S. pneumoniae* im Lungengewebe wurde mittels Immunmarkierungen gegen *S. pneumoniae* untersucht. Die Immunmarkierungen sowie deren Auswertung wurden ebenfalls von Frau Dr. Dietert und Frau Dr. Kershaw durchgeführt. Im Zuge dessen konnte in 21 der 28 untersuchten Lungen eine Immunmarkierung beobachtet werden (10 von 14 *Trpm5*-DTA<sup>+/-</sup> und 11 von 14 *Trpm5*-DTA). Dabei waren vor allem die untersuchten überlebenden Tiere frei von *S. pneumoniae* (5 von 6). Es wurde unterschieden, ob die Immunmarkierung in der Alveolarregion oder perivaskulär zu finden war (Abb. 82A). Eine Auswertung der Immunmarkierungen ergab keine Unterschiede zwischen den beiden Tiergruppen, einzig in der Immunmarkierung der Alveolarregion konnte ein Trend zu einer geringeren Markierung in *Trpm5*-DTA-Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren beobachtet werden (Abb. 82B und C) (Alveolarregion:  $p=0,2315$ ; perivaskulär:  $p=0,9157$ ;  $n=14$ ; Chi-Quadrat-Test).



TRPM5<sup>+</sup>-Zellen pro 2000 µm Basallamina in den infizierten Tieren. Vergleicht man die Anzahl der Zellen der nicht infizierten Tiere mit denen der infizierten Tiere, so unterschieden diese sich, so wiesen die nicht infizierten Tiere eine SCCC-Anzahl von 5 Zellen pro 2000 µm auf, die infizierten Tiere dagegen 12 Zellen pro 2000 µm, dies entspricht einen Anstieg um 140 % ( $p=0,0091$ ; Mann-Whitney-U-Test) (Abb. 83B).



**Abbildung 83: Anzahl an SCCC nach Infektion mit *S. pneumoniae*.** **A:** Anzahl der TRPM5<sup>+</sup>-Zellen in Paraffinschnitten von Tracheen von *Trpm5*-DTA<sup>+/-</sup>-Tieren ohne und nach Infektion. Die Tiere mussten zum jeweiligen Zeitpunkt aufgrund des Erreichens eines Endpunktes, z.B. Gewichtsabnahme >20%, euthanasiert werden. **B:** Zusammengefasste Daten der infizierten Tiere dargestellt in A, die mit *S. pneumoniae* infizierten Tiere wiesen eine höhere Anzahl an TRPM5<sup>+</sup>-Zellen auf ( $p=0,0091$ ; Mann-Whitney-U-Test).

Zusammenfassend lässt sich aus den Infektionsversuchen mit *S. pneumoniae* in einer Dosis von  $2,5 \times 10^5$  CFU pro Tier schlussfolgern, dass kein Unterschied in der Überlebensrate zwischen SCCC-defizienten (*Trpm5*-DTA<sup>-/-</sup>) und den Kontrolltieren beobachtet werden konnte. Ebenfalls konnte kein Unterschied in der Ausprägung der Pneumonie festgestellt werden, einzig eine erhöhte Pneumozyten Typ II-Hyperplasie in den SCCC-defizienten Tieren konnte beobachtet werden. Auch die Erregerzahl im Lungengewebe unterschied sich nicht. Jedoch konnte eine Zunahme in der Anzahl der SCCC nach Infektion beobachtet werden.

## 4. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Entwicklungsdynamik der SCCC im Trachealepithel der Maus in Abhängigkeit von verschiedenen Faktoren wie dem Alter der Versuchstiere oder des Vorhandenseins eines Mikrobioms untersucht. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde untersucht, ob dieser Zelltyp an der Regulation des wichtigen angeborenen Abwehrmechanismus der Atemwege der MC durch Freisetzung von ACh beteiligt ist. Aufgrund der in der Literatur beschriebenen Expression von Bitterrezeptoren in SCCC wurden unter anderem Bitterstoffe als Agonisten eingesetzt. Zudem wurde untersucht, ob bakterielle Peptide die MC beeinflussen und ob SCCC daran beteiligt sind.

Abschließend wurde überprüft, ob das Fehlen, oder die Nichtfunktionalität von SCCC die bakterielle Besiedlung der Atemwege beeinflusst oder Konsequenzen während einer Atemwegsinfektion für das Versuchstier hat.

Im Folgenden werden die Ergebnisse hinsichtlich der zuvor in Abschnitt 1.5 formulierten Fragestellungen diskutiert und abschließend bewertet.

### 4.1 Wann entstehen tracheale SCCC und ist die Entstehung abhängig vom Vorhandensein eines lebenden Mikrobioms?

In dieser Arbeit wurde erstmals die pränatale Existenz der trachealen SCCC nachgewiesen. Die beobachteten Zellen konnten sowohl mit Antikörpern gegen GFP- (ChAT) als auch TRPM5 markiert werden, was diese Zellen eindeutig als SCCC identifizierte.

Die Tragezeit bei Mäusen beträgt zwischen 19-21 Tage, Inzuchtstämme wie C57BL/6J Mäuse weisen eine durchschnittliche Tragezeit von 19 Tage auf (Murray et al. 2010). Das Trachealepithel der Maus besteht bis zum 14 Tage nach Befruchtung aus nur zwei Zelltypen: den Basalzellen und undifferenzierten säulenförmigen Zellen. Erst ab dem fünfzehnten Tag nach Befruchtung differenzieren sich die Zelltypen weiter aus, sodass ab Tag 17 vollausdifferenzierte zilientragende sowie sekretorische Zellen beobachtet werden können (Kawamata und Fujita 1983). Die ersten SCCC konnten in Embryonen mit einem Alter von 18 Tage nach Befruchtung nachgewiesen werden, jedoch nur in sehr geringer Anzahl und somit erst kurz vor der Geburt der Jungtiere.

*Tuft cells* im Darm und Mageneingang entwickeln sich ebenfalls pränatal. So konnten die ersten Zellen am Tag E16.5 beobachtet werden, im Magenkorpus dagegen erst eine Woche nach der Geburt (Saqui-Salces et al. 2011).

SCCC anderer Organe, wie der Urethra und dem Thymus, konnten jedoch erst postnatal beobachtet werden. So wurden die ersten SCCC in Urethren von männlichen Tieren zwischen Tag 6 und 10 nach Geburt und in weiblichen Tieren erst nach 11-20 Tagen beobachtet. Im Thymus dagegen waren die ersten SCCC am Tag der Geburt nachweisbar, jedoch nicht in Embryonen kurz vor der Geburt (Perniss et al. 2021). In den Gallengängen der Ratte konnten *Brush cells* oder SCC erst 4 Wochen nach der Geburt beobachtet werden (Iseki 1991). Zudem konnte ein geschlechtsabhängiger Unterschied in der Anzahl der SCC nachgewiesen werden. So wiesen männliche Tiere anfangs mehr SCC auf als weibliche Tiere (Iseki 1991), ähnlich wie in der Urethra (Iseki 1991; Perniss et al. 2021). Ein geschlechtsspezifischer Unterschied in der Trachea konnte jedoch nicht beobachtet werden (Perniss et al. 2021). Es lässt sich schlussfolgern, dass organspezifische Unterschiede in dem Zeitpunkt der Entstehung bzw. des Erscheinens der SCCC vorliegen. Jedoch sollte angemerkt werden, dass in einigen Organen, wie der Gallenblase oder Nase, bis *dato* nicht untersucht wurde, ob, wann und in welchem Maße sich SCC bzw. SCCC pränatal oder postnatal entwickeln.

Der früheste Zeitpunkt an dem tracheale SCCC von anderen Arbeitsgruppen nachgewiesen wurde, war Tag 3 nach der Geburt. So konnten Voigt und KollegInnen Tas2r131-positive Zellen im Trachealepithel von 3 d alten Jungtieren beobachten. Es erfolgte jedoch keine weitere Charakterisierung oder Quantifizierung dieser Zellen, daher bleibt es fraglich, ob es sich dabei um SCCC handelt. Zudem wurden keine früheren Zeitpunkte untersucht (Voigt et al. 2015). In einer weiteren Studie von Saunders und KollegInnen konnten TRPM5-positive Zellen in 5 Tage alten Jungtieren nachgewiesen werden. Frühere Zeitpunkte wurden in der Studie nicht untersucht (Saunders et al. 2013). In dieser Studie wurde ebenfalls untersucht, ob eine Vermehrung von SCCC durch Proliferation ausdifferenzierter SCCC erfolgen kann. Dies konnte jedoch durch die AutorInnen ausgeschlossen werden. Sie schlussfolgerten daraus, dass sich SCCC aus Basalzellen differenzieren. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Montoro und KollegInnen, welche ebenfalls nachweisen konnten, dass SCCC direkt aus Basalzellen hervorgehen (Montoro et al. 2018). Zudem wurde von Saunders und KollegInnen untersucht, wie langlebig SCCC sind und in welchem Zeitraum sie sich erneuern. In Zuge dessen wurde festgestellt, dass SCCC eine im Vergleich zu den anderen Epithelzelltypen lange Lebenszeit aufweisen und sich, im Gegensatz zu den umliegenden Epithelzellen, nicht selbst erneuern. In *ex vivo* Untersuchungen konnten diese Ergebnisse ebenfalls bestätigt werden. So konnten aus Basalzellen, welche unter ALI-Bedingungen (ALI - *air liquid interface cultures*) gehalten wurden, SCCC differenziert werden. Diese machten jedoch nur 0,01 % aller Epithelzellen aus und exprimierten die typischen SCCC-Marker wie Trpm5 und  $\alpha$ -Gustducin. Diese Methodik wurde bis jetzt jedoch nur einmalig von dieser Arbeitsgruppe veröffentlicht, stellt aber eine sehr interessante Möglichkeit dar, um die Funktion von SCCC *ex vivo* genauer zu untersuchen (Saunders et al. 2013).

In der Arbeit von Saunders und KollegInnen wurde ebenfalls die Zunahme der SCCC-Anzahl im Laufe der postnatalen Entwicklung von Mäusen untersucht. Hierbei konnte eine Zunahme der SCCC in Abhängigkeit vom Alter beobachtet werden, wobei nur vier Zeitpunkte (P5, P10, P15 und P30) untersucht wurden. Dabei wurde festgestellt, dass sich die Anzahl der SCCC proportional zur Zunahme der Gesamtfläche der Trachea erhöhte. Dies deckt sich auch mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zum gleichen Untersuchungszeitraum, wobei sich in den ersten 11 Tagen nach der Geburt die Tracheaoberfläche nicht merklich vergrößert, die Anzahl der SCCC jedoch bereits zunahm.

Die Anzahl an SCCC in adulten Tieren wurde jedoch von Saunders und KollegInnen nicht untersucht. In der vorliegenden Arbeit betrug diese ca. 4000 Zellen pro Trachea, was wiederum ca. 100 Zellen pro mm<sup>2</sup> entspricht. Damit decken sich die Ergebnisse nahezu mit den Beobachtungen von Krasteva und KollegInnen, welche rund 6300 SCCC (*ChAT*-eGFP-positiv) pro Trachea nachweisen konnten. In beiden Arbeiten wurde der gleiche Mausstamm verwendet, wobei von Krasteva und KollegInnen einzelne Bilder ausgezählt und anschließend die Gesamtzellzahl errechnet wurde (Krasteva et al. 2011). In der vorliegenden Arbeit hingegen wurden alle SCCC einer Trachea manuell gezählt. Die Anzahl der SCCC pro mm<sup>2</sup> Trachealoberfläche wurde von Bankova und KollegInnen mit ca. 200 angegeben (DCLK1<sup>+</sup>-Zellen) (Ualiyeva et al. 2020; Bankova et al. 2018). In der vorliegenden Arbeit wurden abhängig vom verwendeten Mausstamm und dem verwendeten SCCC-Marker unterschiedliche Ergebnisse erzielt. So wurden in Tracheen von adulten *ChAT*-eGFP-Tieren ca. 100 Zellen pro mm<sup>2</sup> beobachtet, in Tracheen von *Pou2f3*<sup>+/-</sup>, keimfrei gehaltenen Mäusen und *Myd88*-Wt betrug die SCCC-Anzahl (Trpm5-pos- Zellen) jedoch 200-300 Zellen pro mm<sup>2</sup>. Die Variabilität in den Ergebnissen könnte in den unterschiedlichen verwendeten Antikörpern begründet sein oder für die Abhängigkeit der SCCC-Anzahl vom untersuchten Mausstamm, den Haltungsbedingungen oder für eine Relevanz des Mikrobioms sprechen.

Die Tatsache, dass sich die Anzahl der SCCC in der Trachea besonders nach der Geburt der Tiere erhöht und sich zwischen einzelnen Mausstämmen bzw. Haltungsbedingungen zu unterscheiden scheint, legt eine Beeinflussung der SCCC-Anzahl durch externe Faktoren nahe. Bankova und KollegInnen konnten zeigen, dass die Applikation von klassischen Allergenen wie Hausstaubmilben und Schimmelpilzen die SCCC-Anzahl in der Trachea von adulten Tieren erhöhte (Bankova et al. 2018). Im Darm dagegen führt die Besiedlung mit Endoparasiten zu einer Zunahme der *Tuft cell*-Anzahl (Howitt et al. 2016; Schneider et al. 2018; Moltke et al. 2016). Bakterien könnten ebenfalls die SCCC-Anzahl beeinflussen, entweder durch kommensale Bakterien (Mikrobiom) oder durch Pathogene, welche in den Organismus eindringen. Im umgekehrten Fall führt der Verlust der Funktionalität der

Geschmackstransduktionskaskade in SCC der Gingiva zu einem veränderten Mikrobiom und im Zuge dessen zu Entzündungen der Gingiva (Zheng et al. 2019).

Ein Beispiel für die Beeinflussung der SCCC-Anzahl durch endogene Faktoren stellt der Metabolit Succinat dar. SCCC der Trachea und *Tuft cells* im Darm exprimieren den Rezeptor SucnR1, an welchen Succinat spezifisch bindet (Nadsombati et al. 2018). Succinat kann sowohl von Endoparasiten (z.B. NB), bestimmten Bakterien als auch von Epithelzellen selbst produziert und sezerniert werden (Nadsombati et al. 2018; Nagao-Kitamoto et al. 2016; Riquelme et al. 2019). So weisen gnotobiotische Mäuse eine stark verringerte Succinat-Konzentration im Darm auf (Nagao-Kitamoto et al. 2016; Faith et al. 2014). Die Applikation dieses Metaboliten führt im Darm von Mäusen zu einer *Tuft cell*-Hyperplasie (Lei et al. 2018; Schneider et al. 2018; Billipp et al. 2021; Nadsombati et al. 2018). Lei und KollegInnen konnten zeigen, dass das Mikrobiom im Darm Succinat produziert, welches die *Tuft cell*-Anzahl erhöht (Lei et al. 2018). Schneider und KollegInnen dagegen demonstrierten, dass Succinat durch NB freigesetzt wird und dadurch die *Tuft cell*-Anzahl erhöht (Schneider et al. 2018). Die intratracheale Applikation von Succinat in Kombination mit Denatonium nach einer experimentell induzierten Influenzavirus-Infektion führt dagegen zu einer vermehrten *de novo* Entwicklung von DCLK1<sup>+</sup>-Zellen in der Lunge, ob eventuelles endogenes Succinat in der Lunge jedoch von dem Mikrobiom der Atemwege bzw. Lunge oder von den Epithelzellen selbst produziert werden könnte, wurde jedoch nicht untersucht (Rane et al. 2019). Ebenfalls wurde bis *dato* nicht untersucht, ob die Applikation von Succinat ohne vorherige Influenzavirus-Infektion ebenfalls zu einer Neubildung von SCCC in der Lunge führt oder ob die Anzahl der trachealen SCCC durch Succinat beeinflusst werden kann.

Die Tatsache, dass die SCC-Anzahl in verschiedenen Organen durch Bakterien oder deren Metabolite beeinflusst werden kann, legt nahe, dass dies ebenso in der Trachea der Fall sein könnte. Um dieser Hypothese nachzugehen, wurden in der vorliegenden Arbeit *Tlr2/4*- und *Myd88*-defiziente sowie gnotobiotische Mäuse untersucht. Es zeigte sich, dass sowohl *Tlr2*-, *Tlr4*-, *Tlr2/4*- als auch *Myd88*-defiziente Mäuse eine verringerte SCCC-Anzahl im Vergleich zu den jeweiligen Kontrolltieren aufweisen. Die SCCC-Anzahl der gnotobiotischen Mäusen unterschied sich jedoch nicht von der der Kontrolltiere. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass gnotobiotische Mäuse jedoch durch Futter, Einstreu und andere Faktoren mit TLR-Agonisten in Kontakt kommen. So weisen diese Mäuse sogar eine erhöhte MyD88-Expression im Darm auf (Yamamoto et al. 2012).

Diese Ergebnisse legen nahe, dass bakterielle Bestandteile, welche als TLR-Agonisten dienen, die Expansion von SCCC beeinflussen, jedoch nicht notwendig sind, um SCCC grundsätzlich entstehen zu lassen.

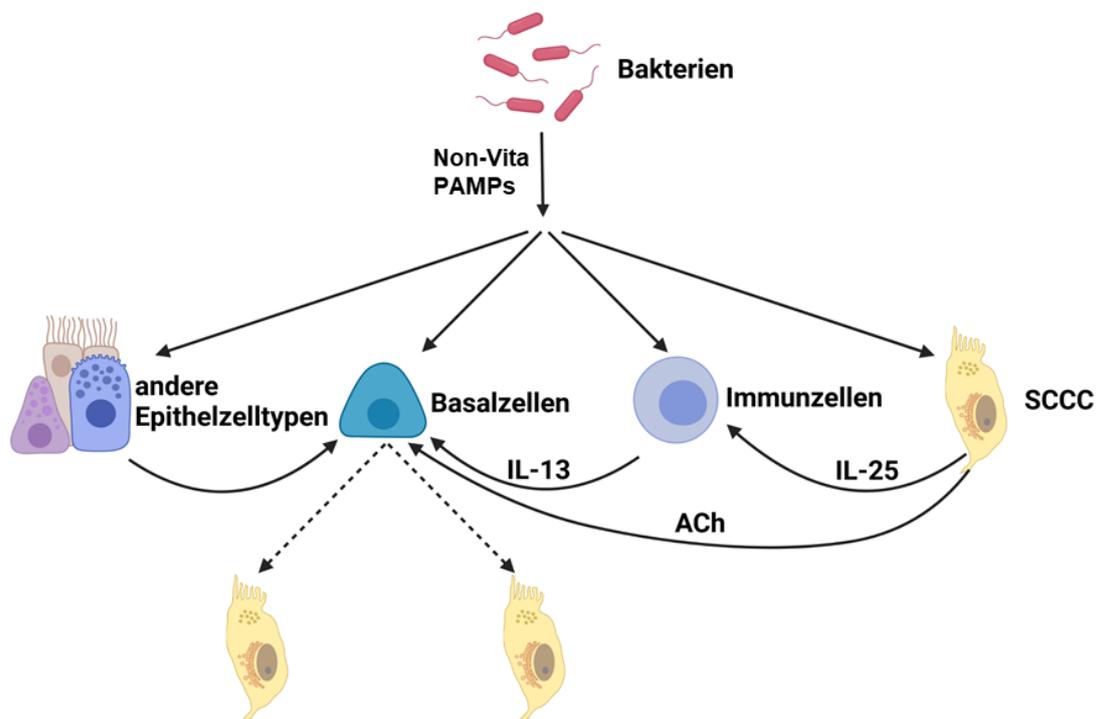
Die Expression von TLR2 und TLR4 ist nicht nur auf Immunzellen beschränkt, sondern ist sowohl in murinen als auch humanen trachealen Epithelzellen beschrieben. Welcher Epithelzelltyp im speziellen TLR exprimiert, wurde jedoch nicht untersucht (Ioannidis et al. 2013). Die TLR2 und TLR4 sind an Umbauprozessen des Atemwegsepithels im Rahmen von Infektionen, asthmatischen Erkrankungen und bei der COPD beteiligt (Li et al. 2017; Wu et al. 2020; Sidletskaia et al. 2020).

Die Expression von MyD88 ist vor allem von Immunzellen bekannt. Mijares und KollegInnen wiesen MyD88 ebenfalls in murinen bronchialen Epithelzellen nach, jedoch wurde ebenfalls nicht näher untersucht, welche Zelltypen im speziellen MyD88 exprimieren (Mijares et al. 2011). Die Deletion von *Myd88* führt in der Trachea zu einer Veränderung der Zusammensetzung des Epithels. So kommt es zu einer Hyperplasie von Becherzellen, sekretorischen Zellen und submukösen Drüsen (Giangreco et al. 2011). Diese Hyperplasien sind jedoch nur postnatal ausgeprägt und können durch postnatale pharmakologische Inhibition von MyD88 ausgelöst werden. Interessant ist, dass *ex vivo* kultivierte Epithelzellen von *Myd88*-defizienten und Wildtypmäusen sich im gleichen Maße in die verschiedenen untersuchten Zelltypen ausdifferenzieren. Dies spricht dafür, dass nicht epitheliale Zellen, welche MyD88 exprimieren, an der Ausdifferenzierung von trachealen Epithelzellen beteiligt sind, sondern z.B. Immunzellen, welche nach Aktivierung MyD88-abhängig Signalmoleküle aussenden, die wiederum die Differenzierung der Basalzellen in die verschiedenen Epithelzelltypen beeinflussen (Giangreco et al. 2011).

Es besteht zudem ein Zusammenhang zwischen der Expression von ChAT und MyD88 in verschiedenen Immunzelltypen wie B-Zellen, dendritischen Zellen und Makrophagen. Diese Zelltypen exprimieren ChAT erst postnatal und in Abhängigkeit von MyD88 und einem vorhandenen Mikrobiom. So weisen *Myd88*-defiziente Mäuse und Mäuse, welche mit Antibiotika behandelt wurden und in Folge dessen ein stark verringertes Mikrobiom besitzen, eine verminderte ChAT-Expression in diesen Immunzelltypen auf. Die Anzahl der verschiedenen Zelltypen bleibt jedoch unverändert (Reardon et al. 2013). Dies spricht zum einen dafür, dass die ChAT-Expression induzierbar ist, und zum anderen für eine TLR-MyD88-vermittelte Beeinflussung der ChAT-Expression. In der vorliegenden Studie konnte ebenfalls beobachtet werden, dass die ChAT-Expression in SCCC mit zunehmendem Alter der Versuchstiere zunahm. So konnten in Jungtieren kurz nach der Geburt (P0-P2) 2-3x so viele TRPM5<sup>+</sup>- wie GFP<sup>+</sup>-Zellen beobachtet werden, in adulten Tieren betrug die Co-Expression von ChAT und TRPM5 in SCCC dagegen 89%. Diese Ergebnisse weisen ebenfalls auf eine Abhängigkeit der ChAT-Expression in SCCC von der Exposition der Versuchstiere mit TLR-Agonisten hin.

Es bestehen verschiedene Möglichkeiten, wie die Exposition gegenüber TLR-Agonisten die SCCC-Anzahl und deren ChAT-Expression beeinflussen könnte. Einige dieser Möglichkeiten sind in Abb. 84 exemplarisch dargestellt. So könnten SCCC selbst TLR exprimieren und in Folge einer Aktivierung durch TLR-Liganden Signalstoffe wie ACh oder IL-25 freisetzen, welche wiederum direkt oder ähnlich wie im Darm über Zwischenschritte auf die Basalzellen wirken. So führt die Freisetzung von IL-25 aus *Tuft cells* im Darm zu einer Rekrutierung und Aktivierung von ILC2, welche wiederum IL-13 freisetzen; dieses beeinflusst abschließend die Ausdifferenzierung der Basalzellen (Howitt et al. 2016; Moltke et al. 2016).

Das Signalmolekül ACh führt im Darm zu einer Proliferation von epithelialen Stammzellen (Raufman et al. 2008; Takahashi et al. 2014). In den Atemwegen ist ACh ebenfalls an der Regulation der Proliferation und Differenzierung von Basalzellen beteiligt (Maouche et al. 2009). Eine Expression von TLR in SCCC ist zwar nicht beschrieben, aber auch nicht explizit untersucht. Zudem besteht die Möglichkeit, dass Immunzellen durch TLR-Agonisten direkt aktiviert werden und anschließend die Ausdifferenzierung der Basalzellen beeinflussen. Zudem könnten andere Epithelzelltypen beteiligt sein, welche Signale an die Basalzellen senden, oder die Basalzellen werden selbst durch TLR-Agonisten in ihrer Differenzierung beeinflusst.



**Abbildung 84: Potentielle Signalwege für die Erhöhung der SCCC-Anzahl durch TLR-Agonisten im Trachealepithel der Maus.**

Die Positionierung von SCCC an vielen mukösen Grenzflächen des Körpers und ihre variable Frequenz in Abhängigkeit von Bakterien, Endoparasiten und deren Metaboliten spricht für eine protektive Funktion dieses Zelltyps, welcher die luminale Zusammensetzung analysiert und im Anschluss protektive Mechanismen einleitet (Finger und Kinnamon 2011; Ting und Moltke 2019; O'Leary et al. 2019; Pan et al. 2020).

### **4.2 Gibt es neben den bekannten Aktivatoren der Mukoziliären Clearance auch andere bakterielle Stoffe, welche diese beeinflussen?**

Mit jedem Atemzug gelangen Schmutzpartikel und Mikroorganismen in die Atemwege. Um den Organismus vor einer Infektion durch die eingeatmeten Pathogene zu schützen, dient zum einen das Atemwegsepithel als physikalische Barriere, zum anderen verhindert die MC das weitere Vordringen der Pathogene in die Lunge (Wanner et al. 1996; Nawroth et al. 2019; Kuek und Lee 2020). Eine Vielzahl an typischen Atemwegspathogenen, wie *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Hemophilus influenza* und *Bordetella pertussis*, bzw. *parapertussis*, produzieren Virulenzfaktoren, welche den Zilienschlag in seiner Intensität oder Koordination beeinträchtigen, um so die MC zu umgehen und den Organismus besiedeln zu können (Jackowski et al. 1991; Bailey et al. 2012; Fliegau et al. 2013; Tuomanen et al. 1983). Neben diesen bakteriellen Pathogenen produzieren aber auch andere Mikroorganismen wie Pilze (*Aspergillus flavus*) Substanzen, welche die MC beeinträchtigen, um so die Atemwege kolonisieren zu können (Lee et al. 2016). Zudem haben auch verschiedene Viren wie, *Corona*-, *Influenza*- und *Rhino*-Viren einen direkten Einfluss auf die MC (Chilvers und O'Callaghan 2000; Fu et al. 2018; Smith et al. 2014). Dem gegenüber stehen Mechanismen, mit denen der Körper diese Pathogen erkennt und im Anschluss Abwehrreaktionen einleitet, um eine Besiedlung zu verhindern. Besonders effektiv und rapide wirken dabei Mechanismen, welche die MC positiv beeinflussen. Dies kann zum einem durch die Erhöhung der Zilienschlagfrequenz, zum anderen durch die vermehrte Freisetzung und Produktion von Muzinen erfolgen (Wanner et al. 1996).

Dabei bestehen wesentliche Unterschiede in der Wahrnehmung von Mikroorganismen und den daraus resultierenden Abwehrmechanismen zwischen den oberen Atemwegen (Nase, Rachen) und den unteren Atemwegen (Trachea und Bronchien). Zudem bestehen Unterschiede zwischen verschiedenen Spezies. In den oberen Atemwegen des Menschen führt die Applikation von verschiedenen bakteriellen Produkten zu einer rapiden Erhöhung der CBF und PTS. Dazu zählen Überstände von *Bacillus cereus* (Carey et al. 2017) und QSM, welche von *Pseudomonas aeruginosa* sezerniert werden (Lee et al. 2012; Freund et al. 2018). In den oberen Atemwegen (Nase) von Mäusen führt die Applikation von QSM ebenfalls zu

einer Erhöhung der PTS (Lee et al. 2014). In den unteren Atemwegen (Trachea) von Mäusen führt die Gabe von QSM ebenso zu einer Erhöhung der PTS (eigene Ergebnisse sowie (Krasteva et al. 2012a; Hollenhorst et al. 2020). Neben den QSM von *Pseudomonas aeruginosa* sind jedoch wenige weitere bakterielle Produkte identifiziert, welche den Zilienschlag erhöhen. So bleibt z.B. unbekannt, welche Substanz in den Überständen von *Bacillus cereus* die CBF erhöht (Carey et al. 2017).

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals die CBF-steigernde Wirkung von bakteriellen formylierten Peptiden nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich, dass nicht alle formylierten Peptide die PTS steigern, sondern in den untersuchten Peptiden eine bestimmte Kern AS-Sequenz dazu notwendig war. Diese besteht vermutlich aus den AS-Abfolgen MKKF bzw. MKKFR, welche formyliert vorliegen müssen, um eine PTS-steigernde Wirkung aufzuweisen (f-MKKF, f-MKKFR).

Wurde die Kern AS-Sequenz erweitert, z.B. durch Anhängen der AS Tryptophan (f-MKKFRW), Tyrosin (f-MKKFRY), Tryptophan und Valin (f-MKKFRWV) oder Tryptophan, Valin, Valin und Leucin (f-MKKFRWVVL), blieb die PTS-steigernde Wirkung erhalten. Ebenso, wenn die letzte AS Arginin (R) des Peptides f-MKKFR durch Lysin (K) ersetzt wurde und zusätzlich weitere Aminosäuren angehängen wurden (f-MKKFKWSI). In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch nicht getestet, ob das Peptid, aus den vier AS f-MKKF allein ebenfalls zu einer Steigerung der PTS führt. Dies erfolgte in einer darauffolgenden Promotionsarbeit von Herrn Moritz Thiel, gleichermaßen durchgeführt am Institut für Anatomie. Hier zeigte sich, dass f-MKKF ebenfalls die PTS-erhöht, jedoch erst ab einer Konzentration von 100 µM. Dagegen lag die EC<sub>50</sub> von f-MKKFRW in der vorliegenden Arbeit bei 0,9 µM. Dies spricht für eine geringere Affinität des Tetra-Peptides gegenüber dem Rezeptor bzw. den Rezeptoren, welche an der Erkennung der Peptide beteiligt sind, oder es impliziert, dass verschiedene Rezeptoren oder Signalwege beteiligt sein könnten. Wurde das Kernmotiv durch Deletion verkürzt bzw. die AS ausgetauscht (f-MKKWRW), verlor das Peptid dagegen die PTS-steigernde Wirkung.

Das Peptid f-MKKFR wird von einer Vielzahl an relevanten Pathogenen, welche die Atemwege von Mäusen und Menschen besiedeln können, als Signalpeptid exprimiert, darunter klassische Pneumonie-Erreger wie *S. pn*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Listeria monocytogenes*, *Bordetella bronchiseptica*, *E. coli*, *Staph. aureus* und weitere. Allein *S. pneumoniae* kann in 12-85% der Patienten, welche wegen einer *community acquired pneumonia* (CAP) behandelt werden müssen, nachgewiesen werden (Torres et al. 2014). Die 13 identifizierten Humanpathogene, welche eine Pneumonie auslösen können und zudem das Signalpeptid f-MKKFR exprimieren, können sogar in 65-69% der stationär behandelten Pneumonie-Patienten nachgewiesen werden (Peto et al. 2014). Die Präsenz der formylierten Peptide f-MKKFR, f-MKFRY, f-MKKFRW und der nicht formylierten

Peptide MKKFRY und MKKFRW konnte zudem in Speichel- und Sputumproben von intubierten COPD-PatientInnen mit einer akuten Pneumonie nachgewiesen werden (Perniss et al. 2020b).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass bakterielle Peptide mit dem Kernmotiv f-MKFF(R) in diversen respiratorischen Pathogenen konserviert vorkommen und zudem in den Atemwegen von Pneumonie-Patienten nachgewiesen werden können. Dies legt nahe, dass diese Peptide geeignete Warnsignale darstellen, um vom Organismus (Mensch und Tier) genutzt werden zu können, die Atemwege auf das Vorhandensein relevanter Pathogene hin zu untersuchen und im Anschluss entsprechende Schutzmechanismen auszulösen.

### 4.2.1 f-MKKFRW steigert die PTS unabhängig von FPR

Formylierte Peptide werden in Mammalia von FPR wahrgenommen. Diese Rezeptoren erkennen jedoch nicht nur formylierte bakterielle Peptide, sondern auch nicht modifizierte Peptide bakteriellen und viralen Ursprungs sowie wirtseigene mitochondriale Peptide, auch Agonisten, welche keine Peptide darstellen, wie Resolvin D1 und Lipoxin A4, sind beschrieben (Bufe et al. 2015; Bufo et al. 2012; Bufo und Zufall 2016). Das Peptid f-MKKFRW aktiviert die murinen Fpr-rs1 (Fpr3), Fpr1 und Fpr2, wenn diese in HEK-Zellen exprimiert werden (Bufo et al. 2019; Perniss et al. 2020b). Bufo und KollegInnen konnten zeigen, dass sensorische Neurone im VNO von Mäusen durch f-MKKFRW aktiviert werden und dass dies abhängig vom Fpr3 geschieht. So führte die Applikation f-MKKFRW zu keiner Aktivierung der Neurone in *Fpr3*-defizienten Mäusen (Bufo et al. 2019). Die Ergebnisse in dieser Studie zeigten, dass Mäuse dieses Peptid über das VNO wahrnehmen können und die Nähe zu dem Peptid vermeiden. So führte das Vermischen von Urin weiblicher Tiere mit f-MKKFRW bei Männchen zu einem Meidungsverhalten; im Gegensatz dazu ist purer weiblicher Urin höchst attraktiv für männliche Mäuse. Die Autoren postulierten daher, dass Tiere, welche mit f-MKKFRW produzierenden Bakterien infiziert sind, vermutlich über die Präsenz von f-MKKFRW in Faeces oder Speichel von anderen Tieren identifiziert und dann zum Schutz vor einer Infektion gemieden werden (Bufo et al. 2019). Bis dato ist nicht bekannt, ob formylierte Peptide auch an andere Rezeptoren neben den FPR binden können. Um zu untersuchen, ob der beobachtete PTS-steigernde Effekt der beschriebenen formylierten Peptide FPR-abhängig ist, wurde in der vorliegenden Arbeit zuerst untersucht, ob FPR in der Trachea von Mäusen exprimiert werden. Der Fpr3 ist laut Literatur exklusiv im VNO von Mäusen exprimiert (Liberles et al. 2009; Rivière et al. 2009). Übereinstimmend mit diesen Befunden konnte auch keine Expression des Fpr3 in der Trachea im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden, weder auf mRNA Ebene mittels RT-PCR, noch in *Fpr3*-Reporter Mäusen. Dagegen konnten in der vorliegenden Arbeit sowohl Fpr1 als auch Fpr2 mittels RT-PCR in der Trachea von Mäusen nachgewiesen werden. Die Expression der beiden Rezeptoren konnte ebenfalls in mechanisch entferntem

Trachealepithel nachgewiesen werden, nicht jedoch in EpCAM-positiven Zellen, welche mittels FACS isoliert wurden. EpCAM, welches auch als CD326 bezeichnet wird, wird von verschiedenen Epithelzelltypen exprimiert, jedoch nicht von nicht-epithelialen Zellen, wie z.B. Immunzellen (Litvinov et al. 1994). Die Expression von Fpr1 und Fpr2 ist vor allem von verschiedenen Immunzellpopulationen, wie Monozyten, Leukozyten und neutrophile Granulozyten, bekannt, nicht jedoch von Epithelzellen (Migeotte et al. 2006; Yang et al. 2001; Yang et al. 2002). Die beobachtete Expression der Fpr1 und Fpr2 in den Trachealepithelproben ist vermutlich auf Immunzellen zurückzuführen, welche sich im Trachealepithel befanden oder als Verunreinigung im Zuge der Präparation der Trachea durch ausgetretenes Blut, in die Probe gelangten. Zudem wurden die Rezeptoren FPR1 und FPR2 pharmakologisch inhibiert und gendefiziente Mausstämme (*Fpr1*, *Fpr3*) verwendet. In allen Experimenten konnten keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen in der Erhöhung der PTS durch f-MKKFRW festgestellt werden. Die *Fpr*-rs3,4,6 und 7 konnten ebenfalls nicht in der Trachea nachgewiesen werden. Zudem führte die Applikation von f-MKKFRW in HEK-Zellen, welche diese Rezeptoren überexprimierten, zu keiner Aktivierung dieser Rezeptoren (Perniss et al. 2020b). Übereinstimmend mit den beschriebenen Ergebnissen führte die Applikation des W-Peptides und des M-Peptides, welche Agonisten für die Rezeptoren Fpr1, Fpr2 und Fpr3 darstellen (Bufe et al. 2012; Bufo et al. 2015), zu keiner Steigerung der PTS. Das um drei AS verlängerte Peptid f-MKKFRWVVL, welches in der vorliegenden Arbeit ebenso die PTS erhöhte, führte ebenfalls zu einer Aktivierung der sensorischen Neurone im VNO (Bufe et al. 2019). Zudem war die verkürzte Variante f-MKKFR, welche die PTS erhöhte, nicht in der Lage, Fpr *in vitro* zu aktivieren (Bufe et al. 2019). Die fehlende Expression der Fpr in trachealen Epithelzellen, die Versuche mit Inhibitoren für die Rezeptoren Fpr1 und 2, die unveränderte Wirkung von f-MKKFRW in den verwendeten gendefizienten Mäusen sowie das Fpr-untypische pharmakologische Profil legen nahe, dass die PTS-steigernde Wirkung von f-MKKFRW nicht durch FPR vermittelt ist und somit erstmalig eine FPR-unabhängige Wirkung von formylierten Peptiden identifiziert wurde.

### 4.3 Sind SCC an der Erkennung dieser neu identifizierten Stoffe beteiligt?

Es ist beschrieben, dass SCC in den oberen und unteren Atemwegen sowie im Darm an der Erkennung von bakteriellen Produkten, wie QSM oder Succinat, beteiligt sind (Saunders et al. 2014; Krasteva et al. 2012a; Hollenhorst et al. 2020; Nadjisombati et al. 2018; Tizzano et al. 2010). Um zu untersuchen, ob tracheale SCC ebenfalls die PTS-steigernden formylierten Peptide erkennen können, wurden in der vorliegenden Arbeit Messungen der  $[Ca^{2+}]_i$  an explantierten Tracheen von Mäusen durchgeführt. Dabei handelte es sich um Mäuse, welche den Calcium-Indikator GCaMP6f unter dem Promotor von TRPM5 exprimieren (*Trpm5-ires-Cre-B6;129S-Gt(ROSA)<sup>26Sortm95.1(CAG-GCaMP6f)Hze/J</sup>* (*Trpm5-GCaMP*). Dieser Mausstamm

ermöglicht es, Änderungen der  $[Ca^{2+}]_i$  in Trpm5-exprimierenden Zellen zu messen (Kusumakshi et al. 2015; Madisen et al. 2015; Perniss et al. 2020b). In den von Brett Boonen und Trese Leinders-Zufall am CIPMM Homburg durchgeführten Experimenten zeigte sich, dass die Applikation von f-MKKFR und f-MKKFRW in einer Subpopulation von Trpm5<sup>+</sup>-Zellen im Trachealepithel (16% und 21%) zu einer Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  führte (Perniss et al. 2020b). Es konnten zudem Trpm5<sup>+</sup>-Zellen identifiziert werden, welche auf beide Peptide reagierten. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Trpm5<sup>+</sup>-Zellen ebenfalls auf die Tas2R-Agonisten Denatonium und Cycloheximid mit einer Änderung der  $[Ca^{2+}]_i$  reagierten. Diese Bitterstoffe dienten als Positivkontrolle (Perniss et al. 2020b). So konnte in SCCC verschiedener Organe, wie der Nase (Tizzano et al. 2010), Urethra (Deckmann et al. 2014) und Trachea (Hollenhorst et al. 2020), bereits ein Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  nach Denatonium-Applikation beobachtet werden. Die durchgeführte Methode erlaubte es jedoch nur Änderungen der  $[Ca^{2+}]_i$  in SCCC zu untersuchen, nicht jedoch in anderen Zelltypen, wie zilienträgenden Zellen. Daher kann aus diesen Versuchen nicht geschlossen werden, dass nur SCCC und nicht auch andere Zelltypen auf die Applikation von formylierten Peptiden mit einer Änderung der  $[Ca^{2+}]_i$  reagierten. Um diese Fragestellung bearbeiten zu können, wären verschiedene Versuchsansätze denkbar. Zum einen könnten die trachealen Explantate der Trpm5-GCamP-Mäuse zusätzlich mit einem weiteren Calciumindikator beladen werden, um so auch andere Zelltypen simultan untersuchen zu können. Zum anderen könnten Mäuse verwendet werden, welche einen Calciumindikator spezifisch in zilienträgenden Zellen exprimieren, z.B. Foxj1-cre Tiere verpaart mit den 129S-Gt(ROSA)<sup>26Sortm95.1(CAG-GCamP6f)Hze/J</sup> Tieren.

Um zu untersuchen, ob SCCC nötig sind, um die PTS-steigernde Wirkung der formylierten Peptide auszulösen, wurden in der vorliegenden Arbeit Versuche mit *Pou2f3*-defizienten Mäusen durchgeführt, welche keine SCCC aufweisen (Yamashita et al. 2017). In diesen Mäusen führte die Applikation der Peptide f-MKKFRW und f-MKKFKWSI zu keiner, bzw. oder nur stark verminderten (Reduktion um ~90% bzw. ~83%) Stimulation der PTS. Diese Ergebnisse konnten mit einem weiteren Mausstamm (Trpm5-DTA), bei dem Trpm5<sup>+</sup>-Zellen durch die Expression von DTA ablatiert wurden, bestätigt werden. In diesen Mäusen führte die Applikation von f-MKKFRW ebenfalls zu keinem Anstieg der PTS. Dieses Tiermodell wurde erstmals in der durchgeführten Arbeit verwendet und durch verschiedene immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern gegen TRPM5, PLCβ2, GNAT3 und DCLK1 validiert. Die Tatsache, dass die Applikation von f-MKKFRW in beiden Tiermodellen, in denen die SCCC unabhängig voneinander ablatiert wurden, zu keiner Erhöhung der PTS führte, schließt eventuelle stammspezifische Effekte aus. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass SCCC notwendig sind, um das Peptid f-MKKFRW zu erkennen, was darauffolgend zu einer Erhöhung der PTS führt.

#### 4.3.1 Sind Komponenten der Geschmackstransduktionskaskade an der Erkennung von f-MKKFRW durch SCCC beteiligt?

An der Erkennung von bakteriellen Produkten durch SCCC in anderen Organen sind Komponenten der Geschmackstransduktionskaskade beteiligt. So ist die Wahrnehmung von Succinat in SCC des Darms von Mäusen abhängig von TRPM5 (Nadsombati et al. 2018). Ebenso ist die Wahrnehmung von QSM in nasalen SCC TRPM5-abhängig (Tizzano et al. 2010; Saunders et al. 2014; Lee und Cohen 2014a). Die Beteiligung an der Wahrnehmung von bakteriellen Produkten durch SCC von GNAT3 ( $\alpha$ -Gustducin), welches eine Untereinheit des G-Proteins darstellt das an Geschmacksrezeptoren gekoppelt ist, konnte ebenfalls in verschiedenen Organen, wie der Nase (Tizzano et al. 2010) und dem Darm (Nadsombati et al. 2018; Lei et al. 2018) dargestellt werden. Diese Komponenten der Signaltransduktion sind an die Aktivierung von Geschmacksrezeptoren der Tas1r- und Tas2r-Familie angeschlossen. Zwei weitere Komponenten in dieser Signaltransduktion stellen PLC $\beta$ 2 und ITPR3 dar (Kinnamon 2012). Immunhistochemische Färbungen, welche im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, zeigten, dass in der Trachea von Mäusen die Proteine TRPM5, PLC $\beta$ 2 und GNAT3 ausschließlich von SCCC exprimiert werden. Dies deckt sich auch mit den Beobachtungen von Krasteva und KollegInnen, welche in der Trachea ebenfalls TRPM5 und PLC $\beta$ 2 exklusiv in SCCC mittels Immunhistochemie und RT-PCR nachweisen konnten (Krasteva et al. 2011). Die Expression von ITPR3 ist jedoch nicht auf SCCC (Nase: Baxter et al. 2021) und Geschmackszellen der Zunge (Clapp et al. 2001) beschränkt. So konnte in den in dieser Arbeit durchgeführten RT-PCR-Experimenten an isolierten trachealen Epithelzellen mRNA, codierend für ITPR3, ebenfalls in GFP- und somit TRPM5-Zellen nachgewiesen werden. Die Expression von ITPR3 ist unter anderem in Cholangiozyten (Hirata et al. 2002), aber auch in diversen tumorassoziierten Geweben, wie Tumore im Kopf und Hals (Hedberg et al. 2016), Magen (Sakakura et al. 2002) und Darm (Shibao et al. 2010) beschrieben. In den hier durchgeführten Experimenten führte die Applikation von f-MKKFRW in Tracheen von *Plc $\beta$ 2*-, *Itrp3*- und *Trpm5*-defizienten Mäusen zu einer Erhöhung der PTS, die im Vergleich zu den korrespondierenden Wildtypen massiv verringert war (Reduktion um ~99%, ~93%, ~95%). Um auszuschließen, dass die Deletion von ITPR3 einen generellen Effekt auf die Fähigkeit der zilientragenden Zellen hat, die CBF als Antwort auf Stimuli zu erhöhen, wurden die bekannten CBF-Aktivatoren ATP und Muskarin (Krasteva et al. 2011; Klein et al. 2009) appliziert. Diese wirken vermutlich direkt auf zilientragende Zellen (Klein et al. 2009; Droguett et al. 2017). Im Zuge der durchgeführten Experimente konnte kein Unterschied zwischen *Itrp3*-defizienten und Kontrolltieren beobachtet werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass die zilientragenden Zellen in Ihrer Funktion durch die Deletion von ITPR3 nicht generell beeinflusst werden.

Es kann daher davon ausgegangen werden, dass alle drei Komponenten der Geschmackstransduktionskaskade (TRPM5, PLC $\beta$ 2 und ITPR3) für die SCC vermittelte-Erhöhung der PTS durch f-MKKFRW notwendig sind.

#### **4.4 Sind SCCC in der Lage ACh aktiv zu sezernieren, und wird durch die neu identifizierten Liganden ACh aus SCCC freigesetzt, welches den Zilienschlag beeinflusst?**

Die Tatsache, dass die f-MKKFRW-induzierte Erhöhung der PTS abhängig von dem Vorhandensein von SCCC ist, lässt vermuten, dass ein Signalweg zwischen SCCC und zilientragenden Zellen besteht und f-MKKFRW nicht direkt auf zilientragende Zellen wirkt.

Wie in der vorliegenden Arbeit und früheren Veröffentlichungen (Krasteva et al. 2011; Brown et al. 2018) gezeigt, sind tracheale SCCC der Maus mit dem für die ACh-Synthese nötigen Enzym (ChAT) ausgestattet. Wiederum stellt ACh einen starken Aktivator für den Zilienschlag in der Trachea dar (Perniss et al. 2020a). Sowohl nikotinische als auch muskarinische ACh-Rezeptoren werden in der Trachea exprimiert und sind an der Erhöhung der CBF durch ACh beteiligt (Klein et al. 2009; Perniss et al. 2020a).

In den Arbeiten von Krasteva und KollegInnen wurde bereits postuliert, dass tracheale SCCC in Folge einer Denatonium- oder QSM-Applikation ACh sezernieren, welches wiederum an nAChR auf sensorischen Nervenfasern bindet. Darauf folgend führte die Aktivierung dieser Nervenfasern zu einer Verringerung der Atemfrequenz, was wiederum als Schutzmechanismus angesehen wurde, um den Körper vor dem weiteren Eindringen potentiell gefährlicher Substanzen zu schützen (Krasteva et al. 2011; Krasteva et al. 2012a).

In weiteren Studien wurde ebenfalls vermutet, dass ACh von SCCC verschiedener Organe freigesetzt wird, so z.B. in der Nase, dem VNO und der Urethra (Saunders et al. 2014; Ogura et al. 2010; Deckmann et al. 2014). Jedoch beruhten die Schlussfolgerungen der Autoren bezüglich der Freisetzung von ACh aus SCCC jeweils nur auf dem indirekten Nachweis der ACh-Freisetzung mittels Inhibitoren für nAChR (Krasteva et al. 2011; Saunders et al. 2014), oder allein aus der Tatsache heraus, dass SCCC in der Lage sind ACh zu produzieren (Ogura et al. 2010). In der Arbeit von Deckmann und KollegInnen wurde gezeigt, dass die beobachtete Kontraktion der Harnblase in Folge der Applikation von Denatonium durch Mecamylamin inhibiert werden konnte und zudem, dass die Applikation von Denatonium zu einer Freisetzung von ACh aus isolierten urethralen Zellen führte. Diese wurde mittels HPLC bestimmt (Deckmann et al. 2014). Es konnte jedoch nicht bewiesen werden, dass das freigesetzte ACh aus SCCC stammt. So wäre eine Freisetzung aus anderen Zelltypen wie Immunzellen oder Neuronen ebenfalls denkbar.

In einer neueren Studie von Krasteva und KollegInnen wurde gezeigt, dass die Gabe von Denatonium (1 mM) zu einem Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  in isolierten trachealen SCCC führte. Die isolierten SCCC wurden zusammen mit den ebenfalls in dieser Arbeit verwendeten CHO-K1 Zellen, welchen den M3R überexprimieren, ausgesät. Wurde Denatonium appliziert, stieg die  $[Ca^{2+}]_i$  zunächst in den SCCC an, darauffolgend auch in den umliegenden M3R-Reportzellen. Der Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  in den SCCC konnte durch die Inhibition der PLC $\beta$ 2 und von TRPM5 verhindert werden. Der Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  in den M3R-Reporterzellen konnte durch die Gabe von Atropin verhindert werden, die Reporterzellen allein reagierten jedoch nicht auf die Applikation von Denatonium (Hollenhorst et al. 2020). Aus diesen Versuchen schlussfolgerten die AutorInnen, dass tracheale SCCC in Folge einer Denatonium-Gabe ACh freisetzen, welches wiederum auf die benachbarten M3R-Reportezellen wirkte. Eine Quantifizierung der ACh-Freisetzung durch SCCC erfolgte in dieser Arbeit jedoch nicht.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die Gabe von f-MKKFRW ebenfalls zu einer Freisetzung von ACh aus trachealen SCCC führt und ob diese generell in der Lage sind, ACh zu produzieren und zu sezernieren.

Um diese Fragestellung zu beantworten, wurden verschiedene Experimente durchgeführt. In Zuge dessen wurde erstmalig gezeigt, dass formylierte Peptide zu einer Freisetzung von ACh aus trachealen SCCC führen. So erhöhte sich die ACh-Konzentration in trachealen Überständen TRPM5-abhängig durch die Gabe von f-MKKFRW. Dies konnte sowohl durch HPLC-Messungen der ACh-Konzentration in trachealen Überständen als auch durch die Applikation dieser Überstände auf M3R-Reporterzellen dargestellt werden. Die Tatsache, dass der beobachtete ACh-Anstieg TRPM5-abhängig war, lässt die Schlussfolgerung zu, dass SCCC in dieser ACh-Freisetzung involviert sind, da diese den einzigen Zelltyp in der Trachea darstellen, welcher TRPM5 exprimiert, eigene Ergebnisse und (Krasteva et al. 2011; Montoro et al. 2018). Die vorliegenden Daten deuten darauf hin, dass, wie von Krasteva und KollegInnen bereits postuliert (Hollenhorst et al. 2020), eine Freisetzung von ACh aus SCCC möglich ist und dass dieses wiederum parakrin auf benachbarte Zelltypen im Epithel wirkt.

In allen entsprechenden Versuchen in dieser Arbeit konnte bereits ein Vorhandensein von ACh in den Überständen von nicht-stimulierten Tracheen beobachtet werden. Dieses ACh könnte aus verschiedenen Quellen freigesetzt worden sein. Mögliche Quellen stellen cholinerge Nervenfasern, SCCC oder Immunzellen dar, welche z.B. durch die Präparation stimuliert wurden und in Folge dessen ACh freisetzen, oder durch die Präparation mechanisch zerstört wurden, und in Folge dessen ACh in die Überstände abgaben. So führt z.B. die Stimulation von nicht-cholinergen sensorischen C-Fasern, welche in das Trachealepithel hineinziehen, zu einer ACh-Freisetzung aus cholinergen Ganglien, welche tief in der Trachealwand lokalisiert

sind und von Axonkollateralen der sensorischen Fasern angesteuert werden (Myers et al. 1996).

In einem weiteren Versuchsaufbau wurde in dieser Arbeit erstmalig mittels einer optogenetischen Methodik untersucht, ob SCCC in der Lage sind ACh freizusetzen. Hierzu wurde ein Mausstamm verwendet, welcher den lichtsensitiven Ionenkanal ChR2 in ChAT-positiven Zellen exprimiert (Zhao et al. 2011). Zusätzlich zu ChR2 exprimieren diese Mäuse noch das fluoreszierende Protein YFP, welches mit ChR2 als Fusionsprotein vorliegt und es ermöglicht, die Expression von ChR2-YFP zu analysieren und zu quantifizieren. Es zeigte sich, dass 44 % der TRPM5-positiven Zellen eine native YFP-Fluoreszenz aufwiesen. Dagegen konnten kaum Zellen beobachtet werden, welche YFP-positiv, aber TRPM5-negativ waren (<1 % der markierten Zellen). Daher ist davon auszugehen, dass ChR2-YFP exklusiv von SCCC im Trachealepithel exprimiert wurde. Ein Teil der parasympathischen Neurone und deren terminalen Endigungen in der Trachea war ebenfalls cholinerg und exprimierte daher die ChAT. Somit wäre eine Expression von ChR2-YFP in diesen Neuronen ebenfalls zu vermuten (Balentova et al. 2013; Brown et al. 2018; Tallini et al. 2006). Es zeigte sich jedoch keine native YFP-Fluoreszenz in Nervenfasern oder Zellkörpern (Ganglien) in der Trachea. Wurde jedoch ein Antikörper gegen GFP (YFP) verwendet, wurden 81 % der TRPM5-positiven Zellen markiert und zudem auch Nervenfasern und Ganglien, welche sich in der Trachea befanden. Diese unterschiedliche Expression von ChR2-YFP unter Kontrolle des ChAT-Promotors könnte auf den verwendeten Mausstamm zurückzuführen sein. So konnten bereits Unterschiede in der GFP-Expression zwischen verschiedenen ChAT-GFP Reporterstämmen beobachtet werden. Brown und KollegInnen beobachteten z.B. Unterschiede in der Expression von GFP (ChAT-Promotor) in Nervenfasern im Herzen und Darm (Brown et al. 2018). In einer weiteren Studie von Keshavarz und KollegInnen wurden ebenfalls Unterschiede in der Expression von ChR2-YFP und ChR2-tdTomato, welche beide unter dem Promotor der ChAT exprimiert wurden, festgestellt. So wiesen ChAT-ChR2-tdTomato-Tiere eine Expression von tdTomato in Nervenfasern der Gallenblase auf, aber nicht in SCC der Gallenblase. Wiederum konnte in dem anderen Mausstamm eine ChR2-YFP-Expression in SCC, aber nicht in Nervenfasern beobachtet werden (Keshavarz et al. 2022). In der vorliegenden Arbeit wurden ebenfalls organspezifische Unterschiede festgestellt. So konnte in cholinergen Nervenfasern der Harnblase eine native YFP-Expression beobachtet werden.

Die Applikation von Licht mit einer Wellenlänge von ~460 nm führt in ChR2-exprimierenden Zellen zu einer Öffnung des ChR2 Ionenkanals und im Anschluss zu einem Einstrom von Kationen in die Zelle (Nagel et al. 2003). In cholinergen Nervenzellen des *Corpus striatum*s führt dies zu einer Depolarisation der Zellmembran und Freisetzung von ACh (Zhao et al.

2011). In der vorliegenden Arbeit führte die Exposition der explantierten Tracheen von ChAT-ChR2-YFP Tieren mit Licht mit einer Wellenlänge von 456 nm in den trachealen Überständen zu einer Erhöhung der ACh-Konzentration. Dies war nicht der Fall, wenn das Epithel mechanisch entfernt wurde. Dies lässt vermuten, dass das freigesetzte ACh aus SCCC stammte. In einem weiteren Versuch wurde untersucht, ob die vermutlich geringere Expression von ChR2-YFP in Nervenfasern und Ganglien im Vergleich zu der in SCCC ausreicht, um eine ACh-Freisetzung aus diesen auszulösen. Das freigesetzte ACh aus Nervenfasern würde anschließend eine Kontraktion der Muskulatur in der Trachea provozieren (Nassenstein et al. 2013). Dies war jedoch nicht der Fall. So konnte in Organbadversuchen keine Kontraktion der Trachea nach LED-Stimulation beobachtet werden (Perniss et al. 2020b). Dagegen führte die LED-Stimulation der Harnblase von ChAT-ChR2-YFP Tieren zu einer Kontraktion der Harnblase (Perniss et al. 2020b). Im Gegensatz zu der Trachea waren in der Harnblase die Nervenfasern auch ohne Antikörpermarkierung YFP-positiv (eigene Ergebnisse). Um die funktionelle Relevanz des freigesetzten ACh aus SCCC zu überprüfen, wurden PTS-Messungen mit Tracheen von ChAT-ChR2-YFP-Tieren durchgeführt. Hier führte die LED-Stimulation zu einer Erhöhung der PTS, nicht jedoch in ChR2-negativen Kontrolltieren. Komplementär zu diesen Ergebnissen führte die Applikation von f-MKKFRW in Mäusen in denen die ChAT spezifisch in Advillin-positiven Zellen deletiert wurde ( $Avil^{cre}$ - $ChAT^{fl/fl}$ ), ebenfalls zu einer verringerten Stimulation der PTS im Vergleich zum Kontrollstamm ( $Avil^{cre}$ - $ChAT^{fl/+}$ ).

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass SCCC in der Lage sind ACh freizusetzen, entweder durch Stimulation mit f-MKKFRW oder durch Depolarisation der Zellmembran im optogenetischen Modell. Dieses freigesetzte ACh wirkt im Anschluss auf benachbarte zilientragenden Zellen und erhöht den PTS und somit die MC.

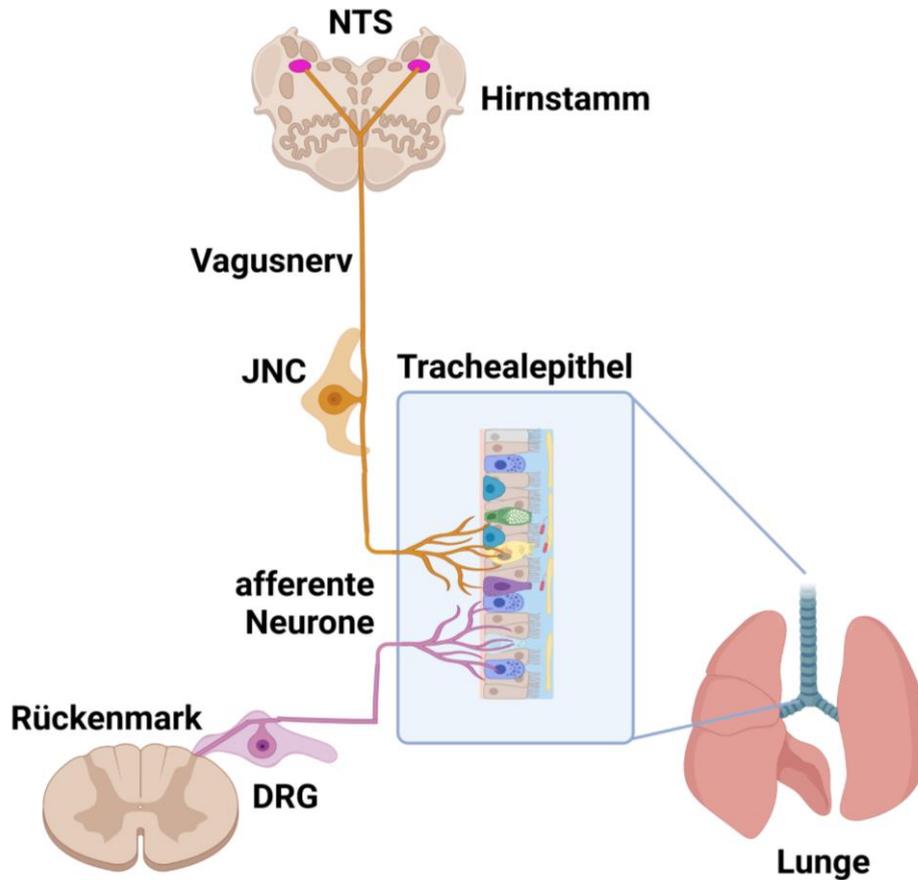
### **4.4.1 Signalübertragung von SCCC auf zilientragende Zellen: Rolle sensorischer Nervenfasern**

Das von trachealen SCCC freigesetzte ACh könnte auf verschiedenen Wegen zu einer Erhöhung der PTS führen. Denkbar wäre zum einen ein direkter parakriner Effekt auf umliegende zilientragende Zellen, oder ein indirekter Effekt, in welchem zusätzlich andere Zelltypen involviert sind. Ein mögliches Beispiel dafür stellen sensorische Nervenfasern dar, welche terminale Endigungen im Trachealepithel aufweisen (Krasteva et al. 2011; Xiao und Wu 2012). Im Gegensatz zu SCCC der Nase, welche in der Mehrzahl in direktem Kontakt zu trigeminalen peptidergen sensorischen Nervenfasern stehen, weisen nur ~6 % der trachealen SCCC einen Kontakt zu peptidergen und ~21 % zu nicht-peptidergen sensorischen

Nervenfasern auf (Tizzano et al. 2010; Krasteva et al. 2011). Eine Beteiligung von Nervenfasern wäre also denkbar. Peptiderge Nervenfasern setzen nach Stimulation Neuropeptide wie CGRP und/oder Substanz P frei (Atanasova und Reznikov 2018). Sowohl CGRP- als auch Substanz P-positive Nervenfasern durchziehen das Trachealepithel der Maus (Krasteva et al. 2011; Xiao und Wu 2012; Mazzone und McGovern 2008). In der Nase der Maus konnte gezeigt werden, dass die SCCC-vermittelte neurogene Entzündung durch die Freisetzung von Substanz P aus Nervenfasern vermittelt ist. Die Übertragung von SCCC zu Nervenfasern findet vermutlich über ACh statt, welches aus SCCC freigesetzt wird, da die beobachtete neurogene Entzündung sowohl durch Mecamylamin, welches nAChR inhibiert, die von Nervenfasern exprimiert werden, als auch durch einen NK1-Rezeptor- (TACR1) Antagonisten inhibierbar war (Saunders et al. 2014).

Zudem ist beschrieben, dass die CBF in der Trachea von Hunden durch Substanz P sowie durch Capsaicin erhöht werden kann (Wong et al. 1991; Eljamal et al. 1994). Capsaicin stellt wiederum einen Agonisten für den Ionenkanal TRPV1 dar, welcher von sensorischen Nervenfasern im Trachealepithel der Maus exprimiert wird (Canning 2011).

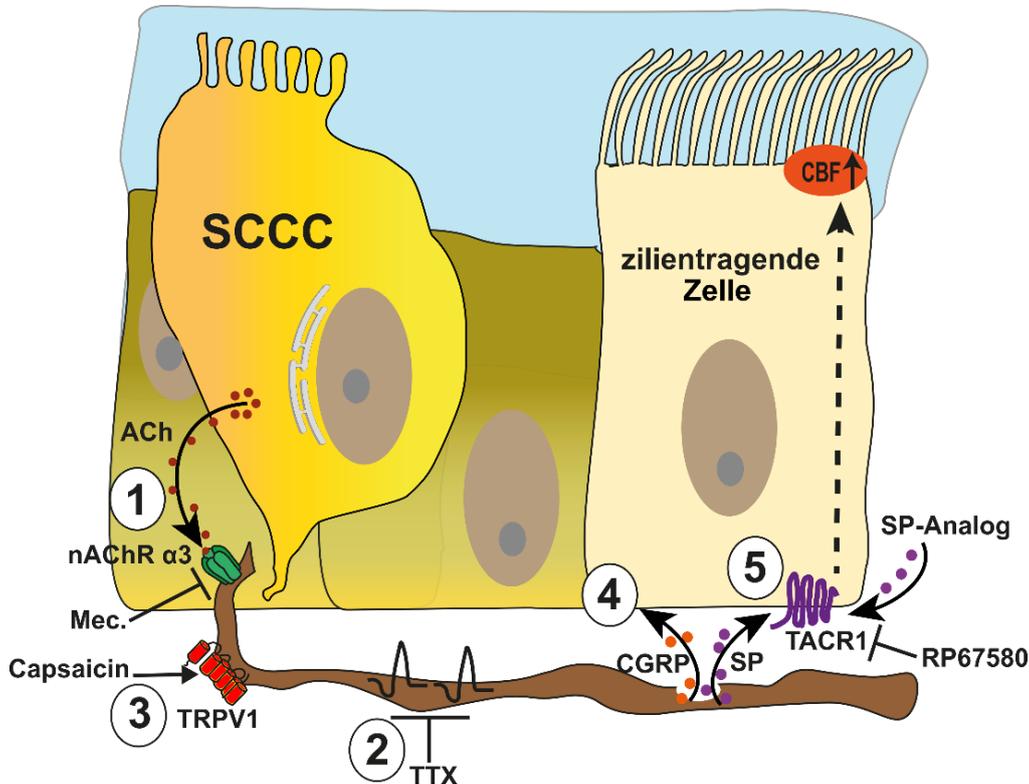
Cholinerge Signalübertragung über SCCC wurde bis dato in zwei verschiedenen Kontexten beschrieben. Dies sind zum einen lokale Effekte, wie z.B. die von Saunders und KollegInnen beschriebene Neurogene Entzündung, ausgelöst durch SCCC in der Nasenschleimhaut, oder zum anderen Effekte, welche einen Reflexbogen involvieren und somit die Reizweiterleitung zwischen Neuronen beinhalten. Diese beschriebenen und über mehrere Neurone vermittelten Reflexe stellen Schutzreflexe dar, welche das Eindringen von für den Körper potentiell schädlichen Substanzen verhindern sollen. Beispiele dafür sind die Unterbrechung der Atmung, ausgelöst durch nasale SCCC oder die Reduktion der Atemfrequenz, ausgelöst durch tracheale SCCC (Saunders et al. 2014; Tizzano et al. 2010; Krasteva et al. 2011). Ein weiteres Beispiel für eine cholinerge Signalübertragung, welche einen Reflexbogen darstellt, ist die SCCC vermittelte Kontraktion der Harnblase, ausgelöst durch urethrale SCCC (Deckmann et al. 2014).



**Abbildung 85: Schematische Darstellung der afferenten Innervation der Trachea der Maus.** (NTS = *Nucleus tractus solitarius*; JNC = *Jugular nodose complex*; DRG = *dorsal root ganglia* (Spinalganglien)).

Die sensible Innervation der Trachea von Nagern findet durch Nervenfasern verschiedenen Ursprungs statt. Zum größten Teil stellen dies Nervenfasern aus pseudounipolaren vagalen Neuronen dar, deren Somata im *Ganglion nodosum* oder *Ganglion jugulare* lokalisiert sind. Beide Ganglien werden zu dem JNC (*jugular nodose complex*) zusammengefasst. Dies wurde z.B. mittels retrograden *tracing* in der Trachea des Meerschweinchens dargestellt (Kummer et al. 1992). Diese vagalen Neurone geben ihre Signale an den *Nucleus tractus solitarius* (NTS), welcher im Stammhirn lokalisiert ist, weiter. Im Anschluss daran wird über mehrere Verschaltungen das Signal an efferente Nervenfasern Richtung Trachea oder Lunge weitergeben, so z.B. beim Auslösen des Hustenreizes (Mazzone und Udem 2016). Es sind jedoch auch wenige sensorische Neurone vorhanden, welche nicht vagalen Ursprungs sind, sondern deren Somata in den Spinalganglien (*dorsal root ganglia* = DRG) zu finden sind. Diese wiederum projizieren in das Rückenmark. Dies konnte sowohl in Meerschweinchen als auch in Ratten dargestellt werden (Kummer et al. 1992; McGovern et al. 2012; Mazzone und McGovern 2010). Die afferente Innervation des Trachealepithels der Maus ist vereinfacht in Abb. 85 dargestellt.

Um zu untersuchen, ob sensorische Nervenfasern an der Erhöhung der PTS durch f-MKKFRW beteiligt sind, wurde eine Reihe an Versuchen durchgeführt, welche eine mögliche Signalübertragung an verschiedenen Stellen unterbrechen sollten. Diese sind in Abb. 86 schematisch dargestellt.



**Abbildung 86: Schematische Darstellung der Angriffspunkte der durchgeführten Versuche. Um eine Rolle von sensorischen Nervenfasern zu untersuchen. Die Ergebnisse werden nachfolgend diskutiert (1-5).**

### **1. Beteiligung $\alpha 3$ -nAChR exprimierender Neurone des JNC.**

Ein Anteil der Somata der sensorischen Nervenfasern, welche das Trachealepithel innervieren und in Kontakt zu SCCC stehen, synthetisieren die nAChR  $\alpha 3$ -Untereinheit. Dies konnte von Krasteva und KollegInnen mittels retrogradem *Tracing* dargestellt werden (Krasteva et al. 2011). Wurden diese Neurone isoliert, reagierten sie sowohl in den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten, als auch in denen von Krasteva und KollegInnen auf die Applikation von Nicotin mit einem Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$ . Diese Experimente zeigen, dass nAChR funktionell von diesen Neuronen synthetisiert werden. Theoretisch könnte ACh, welches von SCCC freigesetzt wird, an nAChR auf Nervenfasern binden und so zu einer Freisetzung von Neuropeptiden aus diesen führen, welche wiederum zu einer PTS-Steigerung führen würde. In den durchgeführten Versuchen zeigte sich jedoch, dass die PTS-steigernde Wirkung nicht durch die Inhibition von nAChR mittels Mecamylamin gehemmt wurde, was eine Beteiligung von nAChR ausschließt. Eine andere Möglichkeit wäre, dass die sensorischen Neurone,

welche mit SCCC in Verbindung stehen, selbst auf f-MKKFRW reagieren und im Anschluss zu einer SCCC-vermittelten ACh-Freisetzung führen. In den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten zeigte sich jedoch, dass die Applikation von f-MKKFRW die  $[Ca^{2+}]_i$  von isolierten nAChR  $\alpha 3$ -exprimierenden Neuronen aus dem JNC nicht veränderte und daher nicht von einer direkten Aktivierung dieser durch f-MKKFRW ausgegangen werden kann. Es konnte zudem nachgewiesen werden, dass die isolierten nAChR  $\alpha 3$ -positiven Neurone den Ionenkanal TRPV1 synthetisieren, da eine Applikation des TRPV1-Agonisten Capsaicin zu einer Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  in diesen führte.

### **2. Mögliche Rolle von spannungsabhängigen Natriumkanälen in der f-MKKFRW-induzierten Steigerung der PTS.**

Für die Reizweiterleitung innerhalb von Neuronen über längere Strecken sowie für die Neurotransmitterfreisetzung an der Synapse mit dem sekundären Neuron ist die Entstehung eines Aktionspotentials essentiell. Dieses wird durch den Einstrom von  $Na^+$ -Ionen durch spannungsabhängige  $Na^+$ -Kanäle ( $Na_v1s$ ) und der dadurch entstehenden Depolarisation des Neurons ausgelöst (Hodgkin und Huxley 1952). Diese  $Na_v$ -Kanäle können in TTX-sensitive und nicht-sensitive Typen eingeteilt werden. Beide Typen spielen bei der Reizwahrnehmung, Weiterleitung und Reflexantwort in den Atemwegen eine Rolle (Kollarik et al. 2018).

In dem untersuchten Modell der explantierten Trachea der Maus spielt die Reizweiterleitung an ein sekundäres Neuron, egal ob dieses im NTS (vagal) oder im Rückenmark (DRG) lokalisiert ist, jedoch keine Rolle, da die Verbindung zu den jeweiligen Strukturen gekappt wurde.

Jedoch bestehen auch Belege dafür, dass lokale Effekte, wie z.B. die durch das Leukotrien D4 (LTD4) induzierte Kontraktion der explantierten Trachea von Meerschweinchen, von der Ausbildung eines Aktionspotentials abhängig sind. Die AutorInnen postulierten, dass LTD4 zu einer Freisetzung des Neurokinins (Tachykinins) Substanz P aus Nervenfasern führt, welches wiederum die beobachtete Kontraktion der Trachea auslöst. Die Freisetzung von Substanz P aus Nervenfasern konnte sowohl ohne Applikation von LTD4, also im Ruhezustand, als auch potenziert nach Gabe von LTD4 beobachtet werden. In beiden Fällen konnte die Substanz P-Freisetzung durch TTX stark vermindert werden (Bloomquist und Kream 1990). Dies spricht dafür, dass die Freisetzung von Neuropeptiden, wie Substanz P, aus afferenten Nervenfasern teilweise abhängig von der Ausbildung eines Aktionspotentials ist und  $Na_v$ -Kanäle beteiligt sind. Zudem spricht es dafür, dass lokal beobachtete Effekte (Kontraktion der Trachea) ohne Beteiligung zentraler Reflexe stattfinden.

Es wäre also denkbar, dass eine Applikation von f-MKKFRW zu einer Freisetzung von Neuropeptiden aus trachealen afferenten Nervenfasern führen könnte, welche TTX-sensitiv

wäre. In den durchgeführten Experimenten konnte jedoch kein Unterschied in der durch f-MKKFRW induzierten Steigerung der PTS zwischen den Versuchen mit TTX und ohne TTX beobachtet werden. Dies spricht gegen eine f-MKKFRW induzierte Bildung eines Aktionspotentials und einer Reizweiterleitung in Nervenfasern.

### **3. Die Beteiligung von TRPV1-positiven Nervenfasern wurde durch die Applikation des TRPV1-Agonisten Capsaicin untersucht.**

Die Applikation des TRPV1-Agonisten Capsaicin (10 nM - 10 µM) führt in der explantierten Trachea der Ratte zu einer dosisabhängigen Freisetzung von CGRP und den Tachykininen Substanz P und Neurokinin A (Hua und Yaksh 1992). Zudem konnte von Eljamal und KollegInnen gezeigt werden, dass Capsaicin (3 nM) die CBF in der Trachea von Hunden *in vivo* erhöht (Eljamal et al. 1994). Im Gegensatz dazu führte die Applikation von Capsaicin (10 - 100 µM) in der explantierten Trachea von Mäusen zu keinem Anstieg der PTS, welche im direkten Zusammenhang mit der CBF steht (Perniss et al. 2020b). Gründe für die unterschiedlichen Effekte von Capsaicin in diesen beiden Modellen könnten in speziesspezifischen Unterschieden zwischen Hunden und Mäusen liegen, oder der von Eljamal und KollegInnen beobachtete Effekt ist von einem Reflexbogen abhängig, welcher das Rückenmark oder den NTS involviert. Beide Strukturen sind in der explantierten Trachea nicht mehr vorhanden. In der explantierten Trachea konnte die Beteiligung von TRPV1-positiven Nervenfasern an der Erhöhung der PTS durch f-MKKFRW jedenfalls ausgeschlossen werden.

### **4 und 5. Die Beteiligung der Neuropeptide CGRP und Substanz P an der f-MKKFRW-induzierten Erhöhung der PTS.**

Ein weiteres Neuropeptid, welches aus peptidergen Nervenfasern freigesetzt werden kann, stellt CGRP dar. Es ist gezeigt, dass CGRP (100 pM – 1 µM) die CBF in verschiedenen Modellen erhöht, z.B. in isolierten humanen zilienträgenden Zellen der Nase und des Rachens sowie in der explantierten Trachea von Hunden (Wolf et al. 1988; Schuil et al. 1995b; Tamaoki et al. 1989). Es scheinen jedoch speziesspezifische Unterschiede zu bestehen. So führt CGRP (1 nM) in der Nase von Kaninchen zu keiner Erhöhung der CBF (Lindberg et al. 1986). In der explantierten Trachea der Maus führte CGRP (10 nM -10 µM) zu keiner Erhöhung der PTS (Perniss et al. 2020b). Die Beteiligung von CGRP an der f-MKKFRW-induzierten Erhöhung der PTS kann daher ausgeschlossen werden.

Die bisher beschriebenen und diskutierten Ergebnisse sprechen gegen eine f-MKKFRW-induzierte Freisetzung von Substanz P. Jedoch stellt Substanz P in verschiedenen Modellen einen starken Aktivator der CBF dar, z.B. in der Trachea des Hundes (Wong et al. 1991) und in isolierten Zellen der Nase des Menschen (Schuil et al. 1995a). In der explantierten Trachea der Maus erhöht Substanz P bzw. dessen pharmakologisch stabiles Analogon ebenfalls die

PTS. Dieser Anstieg der PTS konnte durch den TACR1- (NK1R) Inhibitor RP67580 inhibiert werden (Perniss et al. 2020b; Regoli et al. 1994). Dagegen blieb die f-MKKFRW-induzierte Erhöhung der PTS durch die Applikation des TACR1-Antagonisten unbeeinflusst. Aus diesen Versuchen lässt sich schlussfolgern, dass Substanz P nicht die durch f-MKKFRW induzierte Erhöhung der PTS vermittelt.

Eine Beteiligung von sensorischen Nervenfasern an der Erhöhung der PTS durch formylierte Peptide konnte durch die durchgeführten Experimente nicht bestätigt werden. Erstens,  $\alpha 3$  nAChR-exprimierende Neurone aus dem JNC reagierten nicht auf f-MKKFRW. Zweitens, eine cholinerge Übertragung von SCCC auf sensorische Neurone über nAChR wurde ausgeschlossen. Drittens, die Beteiligung TRPV1-exprimierender Neurone wurde ebenfalls ausgeschlossen. Viertens, die Beteiligung der Neuropeptide CGRP und Substanz P wurde ebenfalls ausgeschlossen. Eine Beteiligung sensorischer Nervenfasern ist daher als sehr unwahrscheinlich anzusehen.

#### **4.4.2 Signalübertragung von SCCC auf zilientragende Zellen: Rolle muskarinischer ACh-Rezeptoren**

Im Trachealepithel von Mäusen werden eine Reihe von nAChR Untereinheiten ( $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 7$ ,  $\alpha 9$ ,  $\alpha 10$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 4$ ) und muskarinischen ACh-Rezeptoren (M1, M3, M4, M5) exprimiert (Hollenhorst et al. 2012; Klein et al. 2009). Wie bereits beschrieben, stellen ACh, Nikotin und Muskarin starke Aktivatoren der CBF in der Trachea der Maus dar (Klein et al. 2009; Perniss et al. 2020a). Aber auch in anderen Spezies konnte gezeigt werden, dass ACh im Atemwegsepithel die CBF steigert, z.B. im Schaf (Salathe et al. 1997) und im Frosch (*Rana ridibunda*) (Zagoory et al. 2001). In der Studie von Do und KollegInnen konnte dies zudem für kultivierte zilientragende Zellen aus dem Nasenepithel von Menschen dargestellt werden (Do et al. 2018). Es wurde gezeigt, dass der CBF-steigernde Effekt von ACh über muskarinische ACh-Rezeptoren vermittelt ist und es im Anschluss an die Bindung von ACh an diese zu einer Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  kommt (Salathe et al. 1997; Zagoory et al. 2001; Do et al. 2018). In den Studien von Salathe und Zagoory und KollegInnen konnte zudem gezeigt werden, dass der muskarinische ACh-Rezeptor M3, der Rezeptor ist, welcher für die ACh-induzierte Erhöhung der CBF im Atemwegsepithel verantwortlich ist. In der vorliegenden Arbeit war die Erhöhung der PTS durch die formylierten Peptide f-MKKFRW, f-MKKFR, f-MKKFRY und f-MKKFKWSI ebenfalls durch die Applikation des generellen muskarinischen ACh-Rezeptor-Antagonisten Atropin inhibierbar. Zudem war der PTS-steigernde Effekt von f-MKKFRW ebenfalls durch den muskarinischen ACh-Rezeptor-M3-Antagonisten 4-DAMP inhibierbar, welcher auch in den Studien von Salathe und Zagoory und KollegInnen verwendet wurde und in diesen die ACh-induzierte CBF-Erhöhung ebenfalls hemmte (Salathe et al. 1997; Zagoory et al. 2001). In

einem weiteren Experiment mit Mäusen, welche eine Defizienz für den muskarinischen ACh-Rezeptoren M3 aufwiesen, war die PTS-steigernde Wirkung von f-MKKFRW ebenfalls stark verringert. Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass das durch die SCCC freigesetzte ACh parakrin auf benachbarte ziliotragende Zellen wirkt und an den muskarinischen ACh-Rezeptor M3 bindet, was im Anschluss zu einer Erhöhung der CBF führte. Dies deckt sich auch mit den Ergebnissen von Klein und KollegInnen, welche ebenfalls nachweisen konnten, dass die durch Muskarin induzierte Erhöhung der PTS (CBF) über den muskarinischen ACh-Rezeptoren M3 vermittelt wird (Klein et al. 2009).

#### **4.5 Führt die Applikation von TasR-Liganden ebenfalls zu einer Stimulation und anschließender ACh-Sekretion aus SCCC?**

Formylierte Peptide stellen Agonisten für Fpr-Rezeptoren dar, deren Beteiligung an der SCCC-vermittelten Steigerung der PTS durch f-MMKFRW jedoch ausgeschlossen werden konnte. Im Fokus der Untersuchungen standen dagegen TasR.

Für eine Beteiligung von TasR an der Erkennung der formylierten Peptide gab es verschiedene Anhaltspunkte: (1) Die Präsenz von verschiedenen Tas1R und Tas2R in trachealen SCCC der Maus, (2) die Abhängigkeit der PTS-steigernden Wirkung der untersuchten formylierten Peptide von Komponenten der Geschmackstransduktionskaskade (PLC $\beta$ 2, ITPR3, TRPM5), und (3) die beschriebene Rolle von TasR bei der Erkennung von anderen bakteriellen Produkten.

Es ist bekannt, dass TasR einige bakterielle Produkte oder bakterielle Bestandteile erkennen können, welche sowohl von gramnegativen als auch von grampositiven Bakterien stammen. So werden z.B. die bereits beschriebenen QSM, welche von gramnegativen Bakterien (wie *Pseudomonas aeruginosa*) produziert werden, teilweise durch humane sowie murine Tas2R erkannt (Lee et al. 2012; Zheng et al. 2019). Dagegen werden einige Produkte grampositiver Bakterien (z.B. von *Streptokokken*) von Tas1R erkannt, dazu zählen spezielle D-Aminosäuren (Lee et al. 2017). Tracheale SCCC der Maus exprimieren sowohl Rezeptoren der Tas1R (Tas1R3)- als auch der Tas2R-Familie (Montoro et al. 2018; Bankova et al. 2018; Krasteva et al. 2011; Liu et al. 2017; Nadsjombati et al. 2018; Hollenhorst et al. 2020).

Um eine Beteiligung von Rezeptoren der Tas1R-Familie zu untersuchen, wurden Agonisten (Sucrose, Glutamat) für (a) die Rezeptorkombination Tas1R2/Tas1R3 (zur Erkennung von Stoffen mit der Geschmacksqualität „Süß“) und (b) die Rezeptorkombination Tas1R1/TasR3 (Zur Erkennung von Stoffen mit der Geschmacksqualität „Umami“), durchgeführt. Beide Agonisten führten jedoch zu keiner Erhöhung der PTS. Zudem war die PTS-steigernde Wirkung von f-MKKFRW in *Tas1r3*-gendifizienten Mäusen unverändert. Diese Ergebnisse

lassen die Schlussfolgerung zu, dass Rezeptoren der Tas1R-Familie nicht an der Erkennung und PTS-steigernden Wirkung von f-MKKFRW beteiligt sind.

Die Fragestellung, ob Rezeptoren der Tas2R-Familie beteiligt sind, stellte sich jedoch komplexer dar. Dies hat mehrere Gründe. Erstens, von den 35 beschriebenen Bitterrezeptoren der Maus konnten 18 in trachealen SCCC nachgewiesen werden (Tab. 26). Zweitens, Tas2R werden von einer Vielzahl an Agonisten aktiviert, so sind über 1000 Agonisten von Tas2R verschiedener Spezies in der Datenbank für Bitterstoffe gelistet (Dagan-Wiener et al. 2019). Drittens, für acht der in trachealen SCCC exprimierten Tas2R sind keine Liganden bekannt. Sie stellen sogenannte *orphan receptors* dar (Tab. 26). Viertens, es sind keine spezifischen Antagonisten für murine Tas2R bekannt.

Um zu untersuchen, ob die Aktivierung von Tas2R durch deren Agonisten zu einer Erhöhung der PTS-führt, wurden diese zunächst appliziert und in einem weiteren Schritt untersucht, ob eine Erhöhung der PTS durch Tas2R-Agonisten ebenfalls von SCCC und der Ausschüttung von ACh aus diesen abhängig ist. Die Agonisten wurden so ausgewählt, dass für jeden in der Trachea exprimierten Tas2R ein Agonist verwendet wurde (unter Ausschluss jener Tas2R, welche *orphan receptors* darstellen).

Die durchgeführten Experimente identifizierten vier Tas2R-Agonisten, welche die PTS erhöhten: 1. Cycloheximid (CHX), 2. Allylisothiocyanat (AITC), 3. das QSM 3-Oxo-C12-HSL (3-Oxo-C12), 4. Denatonium benzoat (Tab.26).

1. Der Bitterstoff CHX stellt unter den Bitterrezeptoren ein selektiver Agonist für den Tas2R105 dar (Lossow et al. 2016). Dieser Rezeptor weist das breiteste Spektrum an Liganden unter den Tas2R auf, aktuell sind 45 Liganden bekannt, welche den Tas2R105 aktivieren (Lossow et al. 2016). Die Expression von Tas2R105 in trachealen SCCC konnte in verschiedenen Publikationen nachgewiesen werden (Tab. 26). Krasteva und KollegInnen demonstrierten, dass CHX zu einer Verringerung der Atemfrequenz nach trachealer Applikation führt und schlussfolgerten aus den durchgeführten Versuchen, dass dieser Effekt SCCC-abhängig ist (Krasteva et al. 2011). Es wurde ebenfalls untersucht, ob CHX (100 µM; n=5) die PTS im Modell der explantierten Trachea steigert, dies war jedoch nicht der Fall (Krasteva et al. 2011). In den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten mit CHX (100 µM) kam es zu einer leichten Erhöhung der PTS um ~12%, diese war jedoch ebenso in SCCC-defizienten Mäusen zu beobachten. Es kann daher geschlussfolgert werden, dass der beobachtete Effekt nicht SCCC-vermittelt ist. Die unterschiedlichen Ergebnisse, zwischen keiner Steigerung der PTS (Krasteva et al. 2011) und der beobachteten geringen Erhöhung der PTS durch CHX in der vorliegenden Arbeit, können nicht abschließend geklärt werden. So wurde das gleiche experimentelle Setup verwendet sowie die gleiche Pufferzusammensetzung. Zudem wurde

CHX in gleicher Konzentration, in gleicher Dauer (10 min) und vom gleichen Hersteller eingesetzt.

2. Der Bitterstoff AITC stellt einen selektiven Agonisten für den Tas2R135 dar (Lossow et al. 2016). Für diesen Rezeptor sind zusätzlich neun weitere Agonisten bekannt, u.a. Den, Saccharin und 5-PTU. Auch dieser Rezeptor wird von trachealen SCCC exprimiert (Tab. 26). Die Gabe von AITC (300  $\mu$ M) erhöhte die PTS um ~44%. Da dieser Effekt jedoch in SCCC-defizienten Mäusen unverändert blieb, ist er nicht auf eine Beteiligung von SCCC zurückzuführen. Weder die MC-steigernde Wirkung von AITC, noch der Effekt von AITC auf SCCC wurde zuvor beschrieben. Interessant wäre es zu untersuchen, ob die durch AITC beobachtete Erhöhung der PTS Tas2R-abhängig ist. So könnten die in dieser Arbeit verwendeten Mäuse, welche eine Defizienz für die Tas2R143, 135 und 126 aufweisen, dazu verwendet werden. Jedoch müssten die stamm-spezifischen Besonderheiten dieses Mausmodells, welche im weiteren Verlauf beschrieben werden berücksichtigt werden (siehe Punkt 4.5.1).

3. Das QSM 3-Oxo-C12 stellt wie CHX ebenfalls einen Agonisten für den Tas2R105 dar (Zheng et al. 2019). Die Gabe von 3-Oxo-C12 (100  $\mu$ M) führte zu einer Erhöhung der PTS um ~48%. Diese blieb in SCCC-defizienten Mäusen ebenfalls unverändert. Zudem verminderte die Applikation von Atropin nicht die 3-Oxo-C12 induzierte Erhöhung der PTS (Perniss et al. 2020b). Beide Experimente sprechen gegen eine Beteiligung von SCCC an der Erhöhung der PTS durch 3-Oxo-C12. In der Arbeit von Zheng und KollegInnen konnte zwar gezeigt werden, dass 3-Oxo-C12 an den Tas2R105 bindet und zu einer Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  von Tas2r105-exprimierenden HEK-Zellen führt, es wurde jedoch nicht untersucht, ob auch gingivale SCCC, welche diesen Rezeptor exprimieren, auf die Gabe von 3-Oxo-C12 reagieren.

4. Denatonium stellt einen Agonisten für die Tas2R105, 135, 140, 144 dar (Lossow et al. 2016). In der vorliegenden Arbeit führte nur die Applikation von 10 mM Denatonium zu einer Erhöhung der PTS um ~16 %, nicht jedoch die Gabe von 0,5, 1, 2 und 5 mM. Die Applikation von 10 mM Denatonium führte jedoch auch zu einer verringerten Reaktion der Trachea auf ATP, welches im Anschluss appliziert wurde. Dies deutet darauf hin, dass die Vitalität des Präparates durch die vergleichsweise hohe Konzentration von Denatonium verringert wurde. In der Arbeit von Hollenhorst und KollegInnen führte die Applikation von 1 mM Denatonium zu einem Anstieg der PTS um ~45 % (n=6, Hollenhorst et al. 2020). Dieser Anstieg konnte durch die Gabe von Mecamylamin (100  $\mu$ M) und Atropin (50  $\mu$ M) in Kombination verhindert werden. Zudem war die PTS-steigernde Wirkung in *Trpm5*-defizienten Tieren ebenfalls nicht zu beobachten (Hollenhorst et al. 2020). Diese Experimente deuten auf eine Beteiligung von SCCC und anschließender ACh-Freisetzung aus diesen hin. Die beobachtete ATP-Antwort nach Gabe von 1 mM Denatonium blieb in der vorliegenden Arbeit unverändert, was gegen eine

Verringerung der Vitalität des Präparates spricht. In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls untersucht, ob Denatonium zu einer SCCC-vermittelten ACh-Freisetzung führt, welche für die beobachtete PTS-Steigerung durch 10 mM Denatonium verantwortlich ist. Es zeigte sich jedoch, dass die Denatonium-induzierte (10 mM) Steigerung der PTS nicht durch Atropin Applikation (10  $\mu$ M) vermindert werden konnte (Perniss et al. 2020b). Die Versuche in der vorliegenden Arbeit mit Denatonium in verschiedenen Konzentrationen als Stimulus wurden von zwei Personen (Alexander Perniss und Tamara Papadakis, AG Kummer) in voneinander unabhängigen Experimenten durchgeführt. Es konnte dabei kein Unterschied zwischen den Ergebnissen festgestellt werden. Damit kann ein personenbezogener Bias ausgeschlossen werden. Denatonium wurde ebenfalls in beiden Studien vom gleichen Hersteller bezogen und in dem Messpuffer gelöst, welcher in beiden Studien eine sehr ähnliche Zusammensetzung aufwies. Zur Klärung der Ursachen für die unterschiedlichen Ergebnisse beider Studien in der PTS-steigernden Wirkung von Denatonium (Hollenhorst et al. 2020; Perniss et al. 2020b) müssten weitere, unabhängige Experimente durchgeführt werden. Der Einsatz von SCCC-defizienten Mäusen bzw. die zellspezifische Ablation von ChAT im Mausmodell wäre ein denkbarer experimenteller Ansatz zur Klärung dieser Frage. Es ist zudem beschrieben, dass Denatonium direkt auf zilienträgende Zellen der Atemwege des Menschen wirkt und zu einer Erhöhung der CBF führt (Shah et al. 2009). Dies konnte ebenso für andere Substanzen gezeigt werden, welche Tas2R-Agonisten darstellen, z.B. die „Bitterstoffe“ Quinin, QSM (C4-HSL, C12-HSL) und von *Pseudomonas aeruginosa* produzierte Quinolon-Signale (PQS). Die beobachtete Erhöhung der CBF durch diese „Bitterstoffe“ wurde durch die Freisetzung von NO aus den zilienträgenden Zellen selbst vermittelt (Freund et al. 2018; Lee et al. 2012; Yan et al. 2017). In diesen Arbeiten wurde immunhistochemisch ebenfalls eine Expression verschiedener Bitterrezeptoren in den humanen zilienträgenden Zellen nachgewiesen. Freund und KollegInnen konnten zudem zeigen, dass die NO-Freisetzung durch zilienträgende Zellen nach Stimulation mit PQS Tas2R-vermittelt ist (Freund et al. 2018). Eine Beteiligung von Komponenten der Geschmackstransduktionskaskade (TRPM5, PLC $\beta$ 2) wurde dagegen nicht untersucht. Es scheinen also speziesspezifische Unterschiede in der Expression von Tas2R und in der Wahrnehmung von Bittersubstanzen durch zilienträgende Zellen zu bestehen, da Tas2R in murinen zilienträgenden Zellen nicht nachgewiesen werden konnten (Liu et al. 2017; Montoro et al. 2018; Plasschaert et al. 2018).

Für alle vier Bittersubstanzen, welche zu einer Erhöhung der PTS in der vorliegenden Arbeit führten, konnte eine Beteiligung von SCCC und der Freisetzung von ACh aus diesen ausgeschlossen werden. Ob die Erhöhung der PTS durch diese Substanzen Tas2R vermittelt ist, konnte nicht aufgeklärt werden und war auch nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Tas2r	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	129	130	131	134	135	136	137	138	139	140	143	144				
Tas2R Agonisten	Expression berichtet	B		B	B, L, M	L	B, L, M, N			B				L	B, N	M	B, L, N									B, L															
	2-Propylthietan (1 mM)																																								
	6-Propyl-2-thiouracil (1 mM)																																								
	5-Propyl-2-thiouracil (1 mM)																																								
	Allylisothiocyanat (0.3 mM)																																								
	Arbutin (3:30:300 mM)																																								
	Cycloheximid (0.1 mM)																																								
	Denatonium benzoat (0.5;1;2.5;10 mM)																																								
	3-Oxo-C6-HSL (0.1 mM)																																								
	3-Oxo-C12-HSL (100 µM)																																								
	Phenylbutazon (0.001 mM)																																								
	Quinin (0.01 mM)																																								
	Sucralose (3 mM)																																								
		Orphan receptor								Orphan receptor								Orphan receptor				Orphan receptor																			

**Tabelle 26:** Tabellarische Zusammenfassung der Tas2R, welche in murinen trachealen SCCC nachgewiesen wurden, und deren bekanntesten Agonisten und deren Effekt auf die PTS. Die Expression wurde zuvor berichtet in B = Bankova et al. 2018, K = Krasteva et al. 2011, L = Liu et al. 2017, M = Montoro et al. 2018, N = Nadjisombati et al. 2018. Modifiziert aus Perniss et al. 2020b.

#### 4.6 Beteiligung von Tas2R an der durch f-MKKFRW-induzierten Erhöhung der PTS

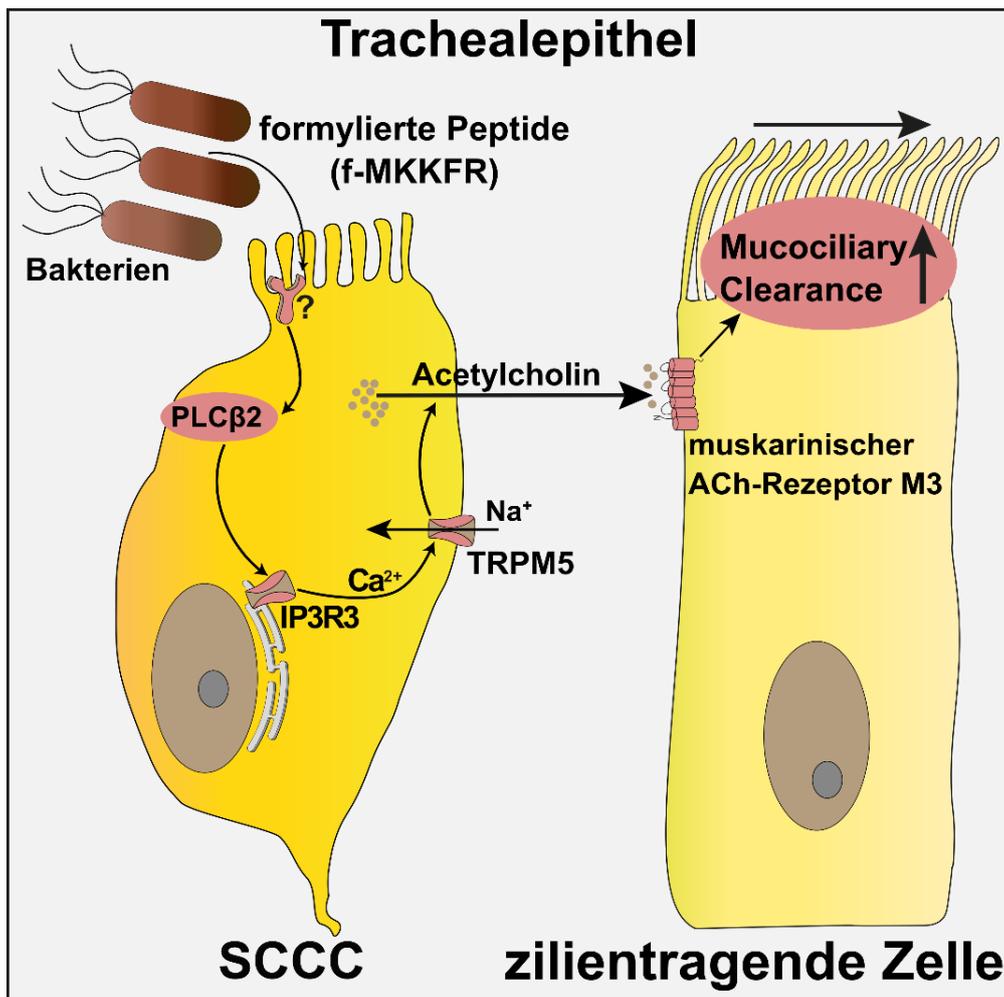
Die Tatsache, dass die durch f-MKKFRW induzierte Erhöhung der PTS abhängig von Komponenten der Geschmackstransduktionskaskade war, deutete auf eine Beteiligung von Tas2R hin. Drei der vier Bitterstoffe (AITC, CHX, Den), welche die PTS erhöhten, stellen Agonisten für den Tas2R135 dar. Dieser Rezeptor und der Rezeptor Tas2R126 sind vergleichsweise hoch in trachealen SCCC der Maus exprimiert (Bankova et al. 2018; Liu et al. 2017; Nadsombati et al. 2018). Diese beiden Rezeptoren werden zusammen mit dem Rezeptor TasR143 in einem Gencluster exprimiert. In Reportermausen, in denen gleichzeitig mit der Expression dieses Genclusters das fluoreszierende Protein mCherry exprimiert wird, waren ~87 % der DCLK1<sup>+</sup>-Zellen (SCCC) ebenfalls mCherry<sup>+</sup> (Liu et al. 2017). Eine Expression von mCherry in trachealen SCCC und in Geschmackszellen der Zunge konnte in der vorliegenden Arbeit ebenfalls bestätigt werden. Um zu untersuchen, ob die Tas2R143/135/126 an der Erhöhung der PTS durch f-MKKFRW beteiligt sind, wurde von Shuya Liu und KollegInnen unter Verwendung der CRISPR/Cas9-Methode ein Mausstamm generiert, bei dem das gesamte Gencluster (31 kb) mittels inserierten loxP-Stellen und anschließender Cre-Rekombination entfernt wurde. Hierzu wurden die loxP Stellen 2153 bp vor das Start-Codon des Tas2R143 und 724 bp nach dem Stop-Codon des Tas2r126 inseriert (Perniss et al. 2020b). Eine erfolgreiche Deletion der Gene für die drei Tas2R wurde mittels RT-PCR in der Zunge überprüft. Die Applikation von f-MKKFRW führte sowohl in homozygoten Wildtyp- als auch in homozygoten *Knockout*-Mäusen zu einer Erhöhung der PTS (~38% und ~23%), obwohl die Erhöhung der PTS in den *Knockout*-Mäusen signifikant geringer war ( $p=0,0258$ ;  $n=12$ ). Diese Ergebnisse deuteten auf eine Beteiligung der drei Tas2R an der Erkennung von f-MKKFRW hin. Jedoch konnten in von Dr. Maryam Keshavarz durchgeführten Kontrollexperimenten an der Harnblase dieses Mausstammes Unterschiede in der durch Muskarin induzierten Kontraktion der Harnblase beobachtet werden (Perniss et al. 2020b), obwohl Tas2R26/135/143 in der murinen Harnblase nicht exprimiert werden. Andere Studien wiesen jedoch auf eine Expression anderer Bitterrezeptoren in der Harnblase hin (Zhai et al. 2016). Zudem wirkt Muscarin unabhängig von Tas2R direkt auf die glatten Muskelzellen der Harnblase und führt zu einer über muskarinische ACh-Rezeptoren vermittelte Kontraktion der Harnblase (Stengel et al. 2002). Es scheinen also Tas2R-unabhängige Effekte in diesem Mausstamm aufzutreten. Mögliche Gründe dafür sind vielfältig. So sind verschiedene sogenannte Off-Target-Effekte bei der angewandten CRISPR-Cas9 bekannt (zusammengefasst von Zhang et al. 2015). Zudem wurden durch die Deletion des gesamten Gen-Clusters, auch die nicht-kodierenden DNA-Abschnitte entfernt, welche zwischen den kodierenden Abschnitten liegen. Es ist jedoch bekannt, dass diese nicht-kodierende DNA eine

hohe Relevanz für eine Vielzahl von physiologischen Prozessen aufweist. So wird ein Teil dieser in funktionale RNA umgeschrieben. Zusätzlich sind kürzere RNA-Abschnitte, wie z.B. microRNA, siRNA und längere RNA-Abschnitte (*long non-coding RNA*) beschrieben, welche die Expression von Genen sowie die posttranslationale Modifikation von Proteinen beeinflussen (zusammengefasst von Wei et al. 2017; Aznaourova et al. 2020). Es wäre also denkbar, dass es durch die Deletion des Gen-Clusters ebenfalls zu einer Deletion von RNA kam, welche z.B. die Expression von muskarinischen ACh-Rezeptoren beeinflusst und so die beobachtete verringerte Wirkung von ACh in der Trachea und der Harnblase erklären würde. Dies wurde jedoch nicht untersucht und bleibt eine theoretische Möglichkeit. Die durch den verwendeten Mausstamm gewonnenen Daten sollten also kritisch betrachtet werden.

In weiteren Untersuchungen zeigte sich zudem, dass die murinen Tas2R nicht durch f-MKKFRW aktiviert werden können. So wurden von Prof. Dr. Bernd Bufe und KollegInnen alle 34 murinen Tas2R zusammen mit Komponenten der Geschmackstransduktionskaskade in HEK-Zellen exprimiert und untersucht, ob diese durch f-MKKFRW stimuliert werden können. Hierzu wurde jeder Tas2R separat in einer Zelllinie exprimiert. Es konnte gezeigt werden, dass der Tas2R105 durch den bekannten Agonisten CHX aktiviert wird und dies zu einer Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  führt, dies validiert das verwendete Expressionssystem. Dagegen konnte in keiner HEK-Zelllinie eine Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  nach Applikation von f-MKKFRW (10, 30 und 60  $\mu$ M) beobachtet werden - unabhängig davon, welcher Tas2R exprimiert wurde (Perniss et al. 2020b). Daraus lässt sich ebenfalls schlussfolgern, dass f-MKKFRW die PTS unabhängig von Tas2R steigert.

Der Rezeptor, welcher für die Erkennung der formylierten Peptide durch tracheale SCCC verantwortlich ist, konnte bis *dato* nicht identifiziert werden. Die durchgeführten Experimente lassen die Schlussfolgerungen zu, dass weder Fpr noch TasR beteiligt sind. Die Beteiligung von Komponenten der Geschmackstransduktionskaskade (TRPM5, PIC $\beta$ 2, ITPR3) spricht für einen GPCR; welcher initial die formylierten Peptide erkennt. Tracheale SCCC exprimieren jedoch eine Vielzahl an GPCR (Montoro et al. 2018; Plasschaert et al. 2018; Liu et al. 2017; Schneider et al. 2018). In SCC anderer Organe ist bereits beschrieben, dass TRPM5-abhängige Effekte über andere GPCR als TasR vermittelt sind, so z.B. über den GPCR *Sucnr1* im Darm (Schneider et al. 2018; Lei et al. 2018; Nadsombati et al. 2018) oder den GPCR *Free fatty acid receptor 2* (FFAR2) in der Gallenblase (Keshavarz et al. 2022).

In Abb. 87 ist der in dieser Arbeit postulierte Signalweg schematisch dargestellt. Es fasst die Vorgänge zusammen, mit dem formylierte Peptide mit dem Kernmotiv f-MKKF durch tracheale SCCC wahrgenommen werden, sowie die darauffolgenden ACh-Freisetzung durch diese und die Wirkung von ACh auf ziliert tragende Zellen.



**Abbildung 87: Schematische Darstellung des postulierten Signalweges der ACh-Freisetzung aus trachealen SCCC der Maus, nach Stimulation mit formylierten Peptiden bakteriellen Ursprungs mit dem Kernmotiv f-MKKFRW.** Die formylierten Peptide werden durch einen nicht identifizierten Rezeptor von SCC wahrgenommen. Dies führt zu einer Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  in SCCC unter Beteiligung der membranständigen Phospholipase PLC $\beta$ 2 und des IP3R3-Rezeptors, welcher im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist. Durch die erhöhte  $[Ca^{2+}]_i$  kommt es zu einer Öffnung des Kationenkanals TRPM5. In Folge dessen strömen Natrium-Ionen in die Zelle und es kommt zu einer Depolarisation der Zellmembran. Dies führt über nicht näher untersuchte Mechanismen zu einer Freisetzung von ACh aus SCCC. Das freigesetzte ACh bindet an die muskarinischen ACh-Rezeptoren des Typs M3, welche von benachbarten zilientragenden Zellen exprimiert werden. Dies führt vermutlich über der Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  in den zilientragenden Zellen zu einem Anstieg der Geschwindigkeit, mit der die Zilien schlagen, und resultiert damit in einer gesteigerten Mukoziliären Clearance durch formylierte Peptide.

In zukünftigen Studien wäre es von hohem Interesse, jenen Rezeptor zu identifizieren, welcher für die Wahrnehmung der formylierten Peptide durch tracheale SCCC verantwortlich ist. Zudem wäre es sehr interessant zu untersuchen, ob auch SCCC anderer Lokalisationen die

identifizierten formylierten Peptide wahrnehmen können und in Folge dessen ebenfalls Mechanismen der angeborenen Immunität auslösen.

#### **4.7 Haben die Unterbrechung der Geschmackstransduktionskaskade oder das Fehlen der trachealen SCCC einen Einfluss auf die bakterielle Besiedlung der Trachea und/oder der Lunge?**

Wenn die aufgestellte Hypothese korrekt ist, dass SCCC die bakterielle Besiedlung der Atemwege überwachen und, falls notwendig, Schutzmechanismen auslösen, welche das weitere Eindringen oder die Verbreitung von potentiell schädlichen Bakterien verhindert, sollten Tiere, in denen SCCC ablatiert oder in denen die Signalkaskade in SCCC unterbrochen wurde, eine höhere Infektanfälligkeit bzw. ein verändertes Mikrobiom aufweisen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Infektion der Mauskolonien in der zentralen Versuchstierhaltung der Justus-Liebig-Universität Gießen mit dem Bakterium *Bordetella pseudohinzii* als „retrospektives“ Infektionsmodell genutzt. Dieses an die Maus adaptierte Bakterium besiedelt die Atemwege von Mäusen und führt zu verschiedenen pathologischen Veränderungen (Ivanov et al. 2016; Clark et al. 2016; Darrah et al. 2017; Dewan et al. 2019; Perniss et al. 2018). So kommt es als Reaktion auf die Infektion mit diesem Erreger zu einem Einstrom von Immunzellen, insbesondere neutrophilen Granulozyten, in die unteren Atemwege und die Alveolen (Clark et al. 2016; Perniss et al. 2018; Darrah et al. 2017). Zudem konnten verschiedene histopathologische Veränderungen des Epithels in den Atemwegen und in der Lunge nachgewiesen werden, welche typisch für eine bakterielle Infektion sind, wie der Influx von Immunzellen in das Epithel oder subepithelial (Clark et al. 2016; Perniss et al. 2018). Sehr prominent ist zudem die Ausbildung von tertiären lymphoiden Strukturen in der Lunge von infizierten Tieren (Clark et al. 2016; Perniss et al. 2018). *Bordetella pseudohinzii* kann sowohl die Atemwege als auch das Mittelohr für eine lange Zeit besiedeln, ohne dass der Wirt in der Lage ist, die Infektion vollständig zu beseitigen. In einer Studie, in denen Mäuse gezielt durch intranasale Applikation von *B. pseudohinzii* (7500 CFU pro Tier) infiziert wurden, konnte noch 98 Tage nach Infektion eine vergleichsweise hohe Bakterienlast in den Atemwegen und im Mittelohr nachgewiesen werden – die Tiere waren somit chronisch infiziert (Dewan et al. 2019).

Besonders interessant ist, dass *B. pseudohinzii* gezielt die MC beeinträchtigt. So weisen infizierte Tiere eine verringerte CBF sowie PTS in der Trachea auf. Zusätzlich kommt es zu einem Verlust an zilienträgenden Zellen im Verlauf einer Infektion (Perniss et al. 2018). Die *ex vivo*-Infektion von murinen Tracheen führte ebenfalls zu einer dosisabhängigen Verringerung der PTS und CBF (Perniss et al. 2018). Tiere, in denen die MC durch Inaktivität

des CFTR gestört ist, weisen zudem eine erhöhte Infektionsrate mit *B. pseudohinzii* und erhöhte inflammatorische Zytokine und Veränderungen in der Atemfrequenz während einer Infektion mit *B. pseudohinzii* auf (Darrah et al. 2017; Litman et al. 2021). Diese Ergebnisse unterstreichen zwei fundamentale biologische Prozesse im Infektionsgeschehen: 1. seitens des Wirtsorganismus: Die Relevanz der MC für die Verhinderung bzw. Beseitigung einer Infektion durch eindringende Bakterien und 2. seitens der Pathogene: Selektionsdruck und Entwicklung von Strategien, um die MC erfolgreich zu umgehen und/oder zu beeinträchtigen.

Die retrospektive und verblindete Analyse der Daten zeigte, dass Tiere, in denen die Geschmackstransduktionskaskade unterbrochen wurde (*Trpm5*-defiziente Tiere), eine höhere bakterielle Last in der Trachea und eine höhere Infektionsrate der Lunge im Vergleich zu den Kontrolltieren aufwiesen. Diese Ergebnisse deuten auf eine Beteiligung von SCCC an der Erkennung von *B. pseudohinzii* und anschließender Einleitung von Schutzmechanismen durch SCCC hin. So exprimiert *B. pseudohinzii* z.B. das *Septation Protein A*, ein Transmembranprotein welches an der Zellteilung beteiligt ist. Dessen AS-Sequenz mit den Aminosäuren MKKFLFD beginnt. Es wäre also möglich, dass SCCC ebenfalls diese MKKFRW ähnliche Sequenz erkennen. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht getestet (Perniss et al. 2020b).

Ein großer Vorteil des hier verwendeten „retrospektiven Infektionsmodells“ ist, dass eine Infektion untersucht wurde, wie sie auch unter „normalen“ Bedingungen in freier Wildbahn zustande kommt. Dabei infizieren sich die Tiere durch Körperkontakt oder durch Kontakt mit infiziertem Material. In einer anderen Studie mit *B. pseudohinzii* konnte dies ebenfalls nachgewiesen werden. Zur Auslösung einer Infektion in zuvor gesunden Tieren ist es ausreichend, entweder ein infiziertes Tier in den Käfig zu setzen oder mit *B. pseudohinzii* besiedeltes Material (Einstreu) in einen Käfig mit gesunden Tieren einzubringen (Clark et al. 2017).

Das analysierte „Modell“ der nicht gezielten *B. pseudohinzii*-Infektion weist jedoch auch Limitationen auf. Es ist nicht bekannt, zu welchem Zeitpunkt der Analyse sich die Tiere infiziert hatten. Jedoch wurden die Versuchstiere unabhängig vom Genotyp zusammen und nur nach den Geschlechtern getrennt gehalten. Eine weitere Limitation besteht darin, dass die *Trpm5*-Defizienz in der gesamten Maus vorlag. Da auch nasale SCCC TRPM5 exprimieren, kann basierend auf diesen Daten nicht differenziert werden, ob die beobachtete erhöhte Infektionsrate der *Trpm5*-defizienten Tiere auf eine Unterbrechung der Signalkaskade in SCCC der Trachea oder Nase oder einer Kombination von beiden zurückzuführen ist. Das Bakterium *B. pseudohinzii* stellt dennoch einen sehr interessanten Modellorganismus dar, da dieser an die Maus angepasst ist und nur eine geringe Bakterienzahl (7500 CFU pro Tier) verwendet werden muss, um die Mäuse langfristig und somit chronisch zu infizieren (Dewan

et al. 2019). Es wäre sehr interessant, gezielte Infektionen durchzuführen, bei denen die Erreger intranasal oder intratracheal appliziert werden. Zudem wäre es interessant, SCCC-defiziente Mäuse zu verwenden, z.B. *Pou2f3*-Ko- oder *Trpm5*-DTA-Tiere. Bis dato sind leider keine Proteine bekannt, welche selektiv in nasalen oder trachealen SCCC exprimiert werden, um eine zelltypspezifische bzw. Lokalisations-abhängige Deletion durchzuführen.

In der vorliegenden Arbeit konnten somit erste Anhaltspunkte dafür gefunden werden, dass die aufgestellte Hypothese, das SCCC die bakterielle Besiedlung der Atemwege überwachen und, falls notwendig, Schutzmechanismen auslösen, richtig ist.

In einem weiteren Modell wurde untersucht, ob SCCC-defiziente Mäuse Unterschiede in der Ausprägung von verschiedenen histologischen Parametern, der Überlebensdauer und Bakterienlast nach intranasaler Infektion mit dem Humanpathogen *S. pneumoniae* aufweisen. Es zeigte sich jedoch, dass in den untersuchten Parametern keine Unterschiede zwischen Mäusen mit SCCC oder ohne SCCC festzustellen waren (*Trpm5*-DTA-Mausmodell). Bei dem verwendeten *S. pneumoniae*-Stamm PN36 (Serotyp 3, NCTC 7978) handelt es sich ursprünglich um ein Isolat aus einem Patienten, welches unter Laborbedingungen vermehrt und charakterisiert wurde (Gor et al. 2005). Das intranasale *S. pneumoniae*-Infektionsmodell mit der verwendeten Dosis von  $2,5 \times 10^5$  CFU oder ähnlicher Dosis pro Tier ist sehr gut etabliert und wurde mehrfach angewandt (Jagdman et al. 2021; Schirm et al. 2020; Berger et al. 2018; Witzentrath et al. 2011). Ziel dieses Modells und der eingesetzten Infektionsdosis ist es, 100 % der Tiere zu infizieren und eine schwerwiegende Pneumonie auszulösen. Dabei liegt die Überlebensrate der Tiere zwischen 20-80 %, abhängig von der eingesetzten Infektionsdosis ( $7,5 \times 10^5$ -  $5 \times 10^6$  CFU pro Tier) (Witzentrath et al. 2011; Berger et al. 2018). In der vorliegenden Arbeit betrug die Überlebensrate bei den *Trpm5*-DTA-Tieren 29 % (3 von 18 Tieren), bei den Kontrolltieren 17 % (5 von 17 Tieren). Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen beiden Versuchsgruppen konnte jedoch nicht festgestellt werden.

Um die Hypothese zu überprüfen, dass SCCC Mechanismen in Gang setzen, welche das Eindringen und die weitere Vermehrung von Bakterien in den Atemwegen verhindern bzw. erschweren, eignet sich das angewandte Modell der *S. pneumoniae* Infektion mit einer vergleichsweise hohen Infektionsdosis jedoch nicht. In diesem Modell wird bereits eine hohe Anzahl an Bakterien appliziert, was zu einer sofortigen Infektion aller Tiere führt. Im Nachhinein wäre es für die formulierte Fragestellung zielführender gewesen, eine geringere Anzahl an Bakterien zu verwenden oder einen anderen Erreger zu nutzen. Es könnte dann untersucht werden, ob Tiere, in denen SCCC ablatiert wurden, ähnlich wie in dem angewandten *B. pseudohinzii*-Modell eine höhere Infektionsrate aufweisen. Es könnten dafür auch andere Erreger genutzt werden, wobei die etablierten Infektionsmodelle alle humanpathogene Bakterien, welchen an den Menschen adaptiert sind, verwenden, so z.B. *Staphylococcus*

*aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter pneumoniae*, *Legionella pneumophila* und *Escherichia coli*. Alle Modelle haben jedoch den Nachteil, dass es in keinem Fall zu einer chronischen Infektion der Versuchstiere kommt, sondern die Versuchstiere entweder die Infektion innerhalb weniger Tage bekämpfen oder daran versterben (Dietert et al. 2017). Das einzige chronische Pneumoniemodell, welches eine alleinige bakterielle Ursache hat, stellt die Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa* dar. Dabei werden die Bakterien jedoch in bzw. an Agar-Kügelchen gebunden und anschließend entweder endoskopisch oder chirurgisch über die Trachea in die Hauptbronchien verbracht. Dort lösen sich die Agar-Kügelchen langsam auf und geben stetig Bakterien über einen gewissen Zeitraum ab, maximal jedoch für 21 Tage. Dies spiegelt eher eine stetige re-Infektion der Tiere dar und keine typische chronische Koloniesierung des Versuchstieres (van Heeckeren und Schluchter 2002; Facchini et al. 2014; Christophersen et al. 2012). Dieses Modell ist jedoch für die hier bearbeitete Fragestellung, ob SCCC an der Erkennung von eindringenden Bakterien beteiligt sind, ungeeignet, da die Bakterien direkt in die Bronchien freigesetzt werden, ohne den natürlichen Infektionsweg über die Atemwege absolvieren zu müssen.

Für zukünftige Infektionsversuche eignet sich daher am besten das intranasale Infektionsmodell mit einer geringen Dosis von *B. pseudohinzii*.

Eine Beteiligung von SCC an der Erkennung und Beeinflussung der Mikrobiota wurde schon für drei andere Organe beschrieben. So unterscheidet sich das Mikrobiom im Ileum von SCC (*tuft cell*)-defizienten Mäusen und den korrespondierenden Wildtyp-Tieren (Banerjee et al. 2020). Zudem führte die Applikation des bakteriellen Metabolit Succinat zu einer Zunahme der SCCC im Dünndarm. Dies konnte zuvor ebenso unabhängig von anderen Arbeitsgruppen beobachtet werden (Banerjee et al. 2020; Nadjisombati et al. 2018). In der vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls eine Zunahme der SCCC beobachtet werden, jedoch nach der Infektion mit *S. pneumoniae*. Diese Ergebnisse weisen erstmalig darauf hin, dass (1) auch bakterielle Infektionen die Anzahl an SCCC verändern, und (2) eine Interaktion zwischen dem Mikrobiom und trachealen SCCC besteht. Diese Daten stehen in Einklang mit den Beobachtungen aus den *Myd88*- und *Tlr2/4*-defizienten Mäusen, in denen eine verringerte SCCC-Anzahl beobachtet wurde. Die Ergebnisse aus den Infektionsversuchen mit *S. pneumoniae* könnten wiederholt werden und zu spezifischen Zeitpunkten *post infectionem* die Anzahl der SCCC untersucht werden. Ebenfalls wäre es interessant zu untersuchen, ob die Zunahme der SCCC auch bei anderen typischen Atemwegspathogenen beobachtet werden kann. In der Studie von Zhang und KollegInnen konnte nachgewiesen werden, dass die Unterbrechung der Geschmackstransduktionskaskade durch Deletion von  $\alpha$ -Gustducin (GNAT3) ebenfalls in einem veränderten Mikrobiom in der Mundhöhle der Versuchstiere resultierte. Dabei verschob sich das Mikrobiom hin zu einer erhöhten Anzahl an pathogenen Bakterienstämmen. Die

*Gnat3*-defizienten Tiere und SCCC-defizienten Tiere (*Pou2f3*-Ko) wiesen zudem eine höhere Bakterienlast in der Mundhöhle und eine verstärkte durch Bakterien verursachte Parodontitis auf (Zheng et al. 2019). Interessanterweise führte die Aktivierung der SCCC durch die Applikation des Bitterstoffes Denatonium in einem Parodontitis verursachendem Modell zu einer verringerten Parodontitis im Vergleich zu der unbehandelten Kontrollgruppe. Dies spricht ebenfalls für die Beteiligung der Geschmackstransduktionskaskade an der Beeinflussung des Mikrobioms durch SCCC (Zheng et al. 2019).

In der Gallenblase scheinen SCCC (*tuft cells*) ebenfalls die Mikrobiota wahrzunehmen. So führt die Applikation des bakteriellen Metaboliten Propionat zu einer Ausschüttung von ACh und CysLT. Dieser Effekt ist ebenfalls TRPM5-abhängig und wird initial über den FFAR2 vermittelt. Dies resultiert ACh-vermittelt zu einer Freisetzung von Muzinen aus den benachbarten Zellen und über CysLT in einer Kontraktion der Gallenblase. Beides sind bekannte Mechanismen in der Gallenblase, welche bei einer bakteriellen Infektion der Gallenblase ausgelöst werden (Keshavarz et al. 2022).

Neben den bereits beschriebenen Mediatoren wie ACh, CysLT und IL-25, welche durch SCCC verschiedener Organe freigesetzt werden, exprimieren tracheale SCCC weitere Mediatoren, wie IL-10, IL-18 und CXCL12 (Bankova et al. 2018; Montoro et al. 2018). Es ist bis *dato* nicht bekannt, durch welche Stimuli SCCC diese Mediatoren freisetzen und welche Effekte diese im Anschluss auslösen. Tracheale SCCC scheinen auch keine homogene Zellpopulation darzustellen. So konnten Montoro und KollegInnen mittels Einzelzellsequenzierung (scRNASeq) zwei tracheale SCC-Cluster (*tuft cell*) voneinander abgrenzen. Ein Cluster (*Tuft-1*) exprimiert vermehrt Komponenten der Geschmackstransduktionskaskade wie *Gnat3*, *Plcβ2*, *Itpr3* und verschiedene *TasR* wie *Tas1r3* und *Tas2r105*, aber auch andere SCCC-spezifische Marker wie *Advillin* und *Pou2f3*. Das andere Cluster (*Tuft-2*) exprimiert dagegen vermehrt Moleküle des CysLT-Syntheseweges wie *Alox5ap* und *Ltc4s*, aber auch klassische Marker wie *Dclk1*. Interessant ist, dass *Trpm5* in beiden *Tuft cell*-Clustern im gleichen Maße exprimiert wird (Montoro et al. 2018). Ob diese beiden beschriebenen SCC-Cluster auch unterschiedliche Funktionen erfüllen oder „nur“ unterschiedliche Aktivitätsstadien der Zellen darstellen, konnte bis *dato* jedoch noch nicht geklärt werden und stellt eine sehr interessante Fragestellung für zukünftige Untersuchungen dar.

### 4.8 Fazit

In der vorliegenden Arbeit konnte eine Klasse formylierter Peptide bakteriellen Ursprungs identifiziert werden, welche den wichtigsten angeborenen Abwehrmechanismus der Atemwege, die MC, akut beeinflusst. Für die Wahrnehmung dieser Peptide sind SCCC essentiell. Über einen nicht identifizierten Rezeptor wird in SCCC eine Signalkaskade ausgelöst, welche zu einer Freisetzung von ACh aus diesen führt. ACh wiederum bindet an muskarinische ACh-Rezeptoren, welche von benachbarten zilientragenden Zellen exprimiert werden. Darauf folgend kommt es zu einer Erhöhung der CBF und somit zu einer gesteigerten MC. Zudem erfolgte mit dieser Arbeit erstmalig der direkte Nachweis einer ACh-Freisetzung aus SCCC mittels einer optogenetischen Methode. Es ist denkbar, dass das freigesetzte ACh weitere Effekte auf benachbarte Zellen hat, was in zukünftigen Studien weiter untersucht werden sollte. Die identifizierten Peptide werden von typischen humanpathogenen Atemwegserregern produziert und konnten in Patientenproben nachgewiesen werden. Ob diese Peptide auch im Menschen zu einer Erhöhung der MC führen oder andere Abwehrmechanismen hervorrufen, wurde nicht untersucht, stellt aber einen sehr interessanten Ansatzpunkt für weitere Studien dar. In der vorliegenden Arbeit konnte zudem erstmals nachgewiesen werden, dass die Beeinträchtigung der Geschmackstransduktionskaskade in SCCC zu einer erhöhten Anfälligkeit der Versuchstiere gegenüber bakteriellen Infektionen der Atemwege führt; auch dieser Punkt sollte in weiteren Studien genauer untersucht werden. SCCC scheinen also die mikrobielle Besiedlung der Atemwege wahrzunehmen und, wenn nötig, Abwehrmechanismen einzuleiten. Sie können somit als Wächterzellen der Atemwege bezeichnet werden.

## 5. Zusammenfassung

Die Mukoziliäre Clearance (MC) stellt den primären Abwehrmechanismus in den Atemwegen dar, welcher für den Abtransport von eingeatmeten Mikroorganismen, Allergenen und Partikeln verantwortlich ist. Die MC wird durch den koordinierten Schlag der zilienträgenden Zellen sowie durch die Produktion von Mucus gewährleistet. Störungen in der MC führen zu verschiedenen Krankheitsbildern, wie der zystischen Fibrose, und zeigen die Relevanz dieses Abwehrmechanismus auf. Die MC wird in erster Linie akut über die Schlaggeschwindigkeit der Zilien reguliert, bekannte Aktivoren stellen verschiedene Signalmoleküle, wie NO, ATP oder Acetylcholin (ACh) dar. In den oberen Atemwegen sowie in der Trachea und den Hauptbronchien der Maus sind sogenannte solitäre chemosensorische Zellen (SCC) lokalisiert. Dieser Zelltyp exprimiert das ACh synthetisierende Enzym ChAT und wird daher auch als solitäre cholinerge chemosensorische Zelle (SCCC) bezeichnet. Zudem exprimieren SCC Komponenten der Geschmackstransduktionskaskade, wie TRPM5 und PLC $\beta$ 2. Durch die Freisetzung von ACh könnten SCC die MC direkt beeinflussen. SCC sind an verschiedenen Stellen des Körpers, an denen dieser gegenüber der Umwelt exponiert ist, lokalisiert, z.B. der Konjunktiva, dem Magen-Darm-Trakt und der Urethra. Dieser Zelltyp scheint im Allgemeinen eine Wächterfunktion einzunehmen. Je nach Organ bestehen Unterschiede in den Stimuli, die SCC aktivieren können, z.B. im Darm Endoparasiten, in der Nase bakterielle Produkte oder Allergene, und den durch die SCC freigesetzten Effektormolekülen, wie Leukotriene, IL-25 oder ACh.

Die ACh-Freisetzung aus SCCC wurde bis dato nur indirekt über Versuche mit Inhibitoren für nAChR nachgewiesen. Ziel dieser Arbeit war es zum einen, die trachealen SCCC, im Besonderen deren postnatale Entwicklung, genauer zu untersuchen, zum anderen, neue Agonisten für SCCC zu identifizieren und zu untersuchen, ob diese oder bereits bekannte Aktivoren zu einer Freisetzung von ACh aus SCCC führen, sowie ob diese die MC beeinflussen. In einem weiteren Abschnitt sollte untersucht werden, ob SCCC in den Atemwegen eine Wächterfunktion einnehmen und ob das Fehlen oder die Unterbrechung der Geschmackstransduktionskaskade innerhalb der SCCC zu einer erhöhten Anfälligkeit der Tiere gegenüber einer bakteriellen Atemwegsinfektion führt. Hierzu wurden verschiedene Mausstämme verwendet, in denen SCCC markiert, SCCC ablatiert oder einzelne Proteine deletiert wurden. Murine Tracheen wurden explantiert, der Zilienschlag (CBF) sowie die MC (PTS) gemessen und der ACh-Gehalt im Überstand bestimmt. Zudem wurde ein optogenetisches Modell verwendet, um die ACh-Freisetzung aus SCCC zu untersuchen. In finalen Experimenten wurden die Anfälligkeit für bakterielle Infekte in zwei Mausstämmen mit zwei verschiedenen Infektionsmodellen untersucht (*B. pseudohinzii* und *S. pneumoniae*).

Es zeigte sich, dass tracheale SCCC bereits kurz vor der Geburt (E18) in geringer Zahl vorhanden sind und sich die Anzahl postnatal rapide erhöht. In adulten Tieren konnte eine verringerte SCCC-Anzahl in *Tlr2/4*- sowie *Myd88*-defizienten Tieren beobachtet werden, dies

spricht für die Interaktion zwischen der bakteriellen Besiedlung der Versuchstiere und der Anzahl der SCCC. Mit Hilfe von PTS-Versuchen konnte mit formylierten Peptiden eine neue Klasse von bakteriellen Produkten identifiziert werden, welche die MC steigern, wobei festzuhalten ist, dass ein bestimmtes Kernmotiv (f-MKKFR) an Aminosäuren notwendig ist, um die MC zu erhöhen. So führte das Peptid f-MKKFRW zu einem Anstieg der CBF um ~70 % und der PTS um ~83 %. Diese Peptide werden hoch konserviert von typischen Atemwegserregern, wie *S. pneumoniae* und *K. pneumoniae*, produziert und konnten zudem in Patientenproben nachgewiesen werden. In weiteren Versuchen wurde gezeigt, dass SCCC und Komponenten der Geschmackstransduktionskaskade essentiell für die Wahrnehmung dieser Peptide sind und diese zu einer ACh-Freisetzung aus SCCC führen. Dieses erhöht direkt den Zilienschlag über den muskarinischen ACh-Rezeptor 3 auf zilientragenden Zellen. Eine Beteiligung von sensorischen Nervenfasern wurde dagegen ausgeschlossen. Die ACh-Freisetzung aus SCCC wurde mit Hilfe von drei Versuchsansätzen bestätigt. Erstens, führte die Applikation von f-MKKFRW zu einer TRPM5-abhängigen ACh-Freisetzung aus SCCC, welche mittels HPLC bestimmt wurde. Zweitens, führte die zelltypspezifische Ablation der ChAT zu einer Verringerung der PTS-steigernden Wirkung von f-MKKFRW. Drittens, führte die optogenetische Stimulation von SCCC ebenfalls zu einer ACh-Freisetzung. Bekannte Aktivatoren von SCCC, sogenannte Bitterstoffe (Denatonium, Cycloheximid), führten jedoch zu keiner ACh-Freisetzung aus SCCC. Durch eine retrospektive und randomisierte Studie an Tieren, welche mit *B. pseudohinzii* infiziert waren, konnte nachgewiesen werden, dass *Trpm5*-defiziente Tiere eine höhere Bakterienlast in der Trachea und eine höhere Infektionsrate der Lunge aufwiesen. Dagegen unterschieden sich Tiere, in denen SCCC ablatiert wurden, nach einer Infektion mit *S. pneumoniae* in verschiedenen Parametern wie der Ausprägung der Pneumonie, nicht von den Kontrolltieren, es konnte jedoch eine Zunahme der trachealen SCCC beobachtet werden.

Aus den gewonnenen Daten lässt sich schlussfolgern, dass tracheale SCCC als Wächterzellen fungieren und bakterielle Produkte, insbesondere formylierte Peptide mit dem Kernmotiv f-MKKFR wahrnehmen können. Erstmals konnte nachgewiesen werden, dass diese Peptide die MC steigern und dass dies durch die Freisetzung von ACh aus SCCC geschieht. Zudem konnte erstmals die direkte ACh-Freisetzung aus SCCC nachgewiesen werden. Das Vorkommen der MC-steigernden Peptide in mehr als 13 typischen Atemwegspathogenen und die Präsenz dieser Peptide in Patientenproben sprechen für eine mögliche klinische Relevanz der neu identifizierten Peptide. Zudem deutet die beobachtete erhöhte Infektanfälligkeit in den Atemwegen von *Trpm5*-defizienten Tieren auf eine Beteiligung dieses Zelltyps an der Früherkennung und Vermeidung von bakteriellen Atemwegsinfektionen hin.

## 6. Summary

Mucociliary clearance (MC) represents the primary defense mechanism in the airways, which is responsible for the removal of inhaled microorganisms, allergens and particles. MC is ensured by the coordinated beat of the ciliated cells and by the production of mucus. Disorders of the MC lead to various clinical pictures, such as cystic fibrosis, and show the relevance of this defense mechanism. Ciliary beat frequency (CBF) is the prime determinant of MC. Known activators are various signaling molecules such as NO, ATP or acetylcholine (ACh). Solitary chemosensory cells (SCC) are localized in the upper airways as well as in the trachea and main bronchi of mice. This cell type expresses the ACh-synthesizing enzyme choline acetyltransferase (ChAT) and is, therefore, referred to as solitary cholinergic chemosensory cells (SCCC). They express components of the taste transduction signaling cascade, like TRPM5 and PLC $\beta$ 2. By releasing ACh, SCCC could directly affect MC. SCCC are localized at different sites of the body where they are exposed to the environment, e.g. the conjunctiva, the intestinal tract and the urethra. This cell type generally appears to serve a sentinel function. Depending on the organ, there are differences in the stimuli that can activate SCCC, e.g. endoparasites in the gut, bacterial products or allergens in the nose, and in the effector molecules released by SCCC, such as leukotrienes, IL-25 and ACh.

To date, ACh release by SCCC has only been indirectly demonstrated through experiments with nAChR inhibitors. The aim of this work was on the one hand to examine the tracheal SCCC, in particular their postnatal development, in more detail, on the other hand to identify new agonists of SCCC and to investigate whether they - or already known - activators lead to the release of ACh from SCCC, and whether these having an impact on the MC. In a further section, it was addressed whether SCCC have a sentinel function in the airways and whether their absence or disruption of the taste transduction cascade within the SCCC leads to an increased susceptibility of the animals to bacterial airway infections. For this purpose, different mouse strains were used, which either helped to identify SCCC, ablate SCCC or in which single proteins were deleted. Murine tracheas were explanted and the CBF and particle transport speed (PTS) were measured. Furthermore, ACh-content in the tracheal supernatants was analyzed by HPLC. In addition, an optogenetic model was used to study ACh release from SCCC. In final experiments, the susceptibility to bacterial infections was investigated in two mouse strains using two different infection models (*B. pseudohinzii* and *S. pneumoniae*).

It was found that tracheal SCCC are already present in small numbers shortly before birth (E18) and that their number increases rapidly postnatally. In adult animals, a reduced number of SCCC was observed in *Tlr2/4*- and *Myd88*-deficient animals, which points towards an interaction between bacterial colonization of the animals and the number of SCCC. Using PTS-

experiments, a new class of bacterial products increasing MC was identified, namely formylated peptides. Notably, a certain core motif (f-MKKFR) of amino acids was necessary to increase MC. The peptide f-MKKFRW increased CBF by ~70 % and PTS by ~83 %. These peptides are produced in a highly conserved form by typical respiratory pathogens such as *S. pneumoniae* and *K. pneumoniae*, and have also been detected in patient samples. Further experiments showed that SCCC and components of the taste transduction cascade are essential for the recognition of these peptides. This leads to ACh release from SCCC, which directly increases CBF by acting upon the muscarinic ACh receptor 3 on ciliated cells. In contrast, an involvement of sensory nerve fibers was ruled out. ACh release from SCCC was confirmed using three experimental approaches. First, the application of f-MKKFRW led to a TRPM5-dependent ACh release from SCCC, which was determined by HPLC. Second, the cell type-specific ablation of ChAT within SCCC led to a reduction in the PTS-increasing effect of f-MKKFRW. Third, optogenetic stimulation of SCCC also resulted in a release of ACh. However, previously known activators of SCCC, so-called bitter substances (denatonium, cycloheximide), did not lead to any ACh release from SCCC. A retrospective and randomized study on animals infected with *B. pseudohinzii* showed that *Trpm5*-deficient animals had a higher bacterial load in the trachea and a higher infection rate of the lungs. In contrast, animals in which SCCC were ablated and which were infected with *S. pneumoniae* did not differ from the control animals in various parameters such as the severity of the pneumonia, but, interestingly, an increase in tracheal SCCC was observed.

From the obtained data, it can be concluded that tracheal SCCC act as sentinel cells, which detect bacterial products, in particular formylated peptides with the core motif f-MKKFR. It was shown for the first time, that these peptides increase MC by releasing ACh from SCCC. In addition, the direct release of ACh from SCCC was demonstrated for the first time. The occurrence of the MC-enhancing peptides in more than 13 typical respiratory pathogens and the presence of these peptides in patient samples points towards a possible clinical relevance of the newly identified peptides. In addition, the observed higher susceptibility of *Trpm5*-deficient mice to airway infections indicates that this cell type is involved in the early detection and prevention of bacterial airway infections.

## 7. Publikationen und Auszeichnungen

\*geteilte Erstautorenschaft

### 7.1 Publikationen, welche direkt aus der Promotionsarbeit hervorgegangen sind

**Perniss A\***, Schmidt P\*, Soultanova A, Papadakis T, Dahlke K, Voigt A, Schütz B, Kummer W, Deckmann K. „**Development of epithelial cholinergic chemosensory cells of the urethra and trachea of mice**”. *Cell and Tissue Research*. 2021 Jul;385(1):21-35.

**Perniss A**, Liu S, Boonen B, Keshavarz M, Ruppert AL, Timm T, Pfeil U, Soultanova A, Kusumakshi S, Delventhal L, Aydin Ö, Pyrski M, Deckmann K, Hain T, Schmidt N, Ewers C, Günther A, Lochnit G, Chubanov V, Gudermann T, Oberwinkler J, Klein J, Mikoshiba K, Leinders-Zufall T, Offermanns S, Schütz B, Boehm U, Zufall F, Bufe B, Kummer W. „**Chemosensory Cell-Derived Acetylcholine Drives Tracheal Mucociliary Clearance in Response to Virulence-Associated Formyl Peptides.**“ *Immunity*. 2020 Apr 14;52(4):683-699.e11.

### 7.2 Publikationen, welche innerhalb des Promotionszeitraums veröffentlicht wurden

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.** *Science Immunology*. 2022 Mar 4;7(69):eabf6734.

Mahmoud W\*, **Perniss A\***, Poharkar K, Soultanova A, Pfeil U, Hoek A, Bhushan S, Hain T, Gärtner U, Kummer W. **CXCL13 is expressed in a subpopulation of neuroendocrine cells in the murine trachea and lung.** *Cell and Tissue Research*. 2021 Nov 11.

La Pietra L, Hudel M, Pillich H, Abu Mraheil M, Berisha B, Aden S, Hodnik V, Lochnit G, Rafiq A, **Perniss A**, Anderluh G, Chakraborty T. **Phosphocholine Antagonizes Listeriolysin O-Induced Host Cell Responses of *Listeria monocytogenes*.** *Journal of Infectious Diseases*. 2020 Oct 1;222(9):1505-1516.

**Perniss A**, Latz A, Boseva I, Papadakis T, Dames C, Meisel C, Meisel A, Scholze P, Kummer W, Krasteva-Christ G. **Acute nicotine administration stimulates ciliary activity via  $\alpha 3\beta 4$  nAChR in the mouse trachea.** *International Immunopharmacology*. 2020 Jul;84:106496.

Lodes N, Seidensticker K, **Perniss A**, Nietzer S, Oberwinkler H, May T, Walles T, Hebestreit H, Hackenberg S, Steinke M. **Investigation on Ciliary Functionality of Different Airway Epithelial Cell Lines in Three-Dimensional Cell Culture.** *Tissue engineering Part A*. 2020 Apr;26:432-440.

Kandel C, Schmidt P, **Perniss A**, Keshavarz M, Scholz P, Osterloh S, Althaus M, Kummer W, Deckmann K. **ENaC in Cholinergic Brush Cells.** *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2018 Aug 15;6:89.

Richter K, Koch C, **Perniss A**, Wolf PM, Schweda EKH, Wichmann S, Wilker S, Magel I, Sander M, McIntosh JM, Padberg W, Grau V. **Phosphocholine-Modified Lipooligosaccharides of Haemophilus influenzae Inhibit ATP-Induced IL-1 $\beta$  Release by Pulmonary Epithelial Cells.** *Molecules*. 2018 Aug 8;23(8):1979.

**Perniss A**, Schmidt N, Gurtner C, Dietert K, Schwengers O, Weigel M, Hempe J, Ewers C, Pfeil U, Gärtner U, Gruber AD, Hain T, Kummer W. **Bordetella pseudohinzii targets cilia and impairs tracheal cilia-driven transport in naturally acquired infection in mice.** *Scientific Reports*. 2018 Apr 9;8(1):5681.

Koenig S, Bredehöft J, **Perniss A**, Fuchs F, Roth J, Rummel C. **Age Dependent Hypothalamic and Pituitary Responses to Novel Environment Stress or Lipopolysaccharide in Rats.** *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. 2018 Mar 19;12:55.

Wichmann L, Vowinkel KS, **Perniss A**, Manzini I, Althaus M. **Incorporation of the  $\delta$ -subunit into the epithelial sodium channel (ENaC) generates protease-resistant ENaCs in Xenopus laevis.** *Journal of Biological Chemistry*. 2018 May 4;293(18):6647-6658.

**Perniss A**, Preiss K, Nier M, Althaus M. **Hydrogen sulfide stimulates CFTR in Xenopus oocytes by activation of the cAMP/PKA signalling axis.** *Scientific Reports*. 2018 Mar 8;8(1):4420.

### 7.3 Auszeichnungen

- 09/2018                    **„Early Career Researcher Poster Competition Winner“**  
The Physiological Society, Europhysiology, London
- 09/2018                    **„Posterpreis“**  
der Anatomischen Gesellschaft, Rostock
- 02/2018                    **„Poster Award“**  
des Deutschen Zentrums für Lungenforschung, Bad Nauheim
- 10/2017                    **“Young Investigator Award 2017”**  
der Anatomischen Gesellschaft, Würzburg

## 8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Zelltypen des Trachealepithels der Maus.....	2
Abbildung 2: Schematischer Aufbau der Komponenten der Mukoziliären Clearance in der Trachea. ....	6
Abbildung 3: Schematischer Aufbau einer sekundären Zilie. ....	9
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Zilienschlages. ....	11
Abbildung 5: Schematische vereinfachte Darstellung des Toll-Like Rezeptor (TLR)-Signalweges. ....	14
Abbildung 6: Diversität der FPR-Genfamilie im Menschen und in der Maus. ....	16
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Struktur von bakteriellen Signalpeptiden. ....	18
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Zelltypen in einer Geschmacksknospe der Zunge. ....	20
Abbildung 9: Schematische Darstellung der Rezeptoren verantwortlich für die Wahrnehmung der Geschmacksmodalitäten sauer, salzig, fettig, umami, süß und bitter. ....	23
Abbildung 10: Schematische Darstellung der Geschmackstransduktionskaskade in Typ II-Geschmackszellen. ....	25
Abbildung 11: Präsenz von SCC in der Maus. ....	28
Abbildung 12: Schematische Darstellung der Erkennung von Endoparasiten durch SCC im Darm der Maus. ....	35
Abbildung 13: Schematische Darstellung der Funktionen der SCC im respiratorischen Nasenepithel der Maus. ....	39
Abbildung 14: Schematische Darstellung der Funktionen der SCC im Trachealepithel der Maus. ....	42
Abbildung 15: Kontrolle für die mechanische Entfernung des Trachealepithels. ....	67
Abbildung 16: Schematische Darstellung der Immunhistochemie an Gewebeschnitten. ....	69
Abbildung 17: Schematische Darstellung der Immunhistochemie an Whole-Mount-Präparaten. ....	70
Abbildung 18: Quantifizierung von SCC an Whole-Mount-Präparaten. ....	71
Abbildung 19: Schematische Darstellung der Isolation von Epithelzellen aus der Trachea. ....	73
Abbildung 20: Gating-Strategie für die Isolation von GFP-positiven (rotes Rechteck) und GFP-negativen (schwarze Markierung) Epithelzellen. ....	74
Abbildung 21: Versuchsaufbau für Partikeltransport- und Zilienschlagmessungen. ....	81
Abbildung 22: Präparation der Trachea für Partikeltransport- und Zilienschlagmessungen. ....	82
Abbildung 23: Auswertung der PTS-Messungen. ....	84
Abbildung 24: Auswertung der CBF-Messungen. ....	85
Abbildung 25: Stimulation der Trachea durch f-MKKFRW für ACh-Konzentrationsmessungen. ....	86

Abbildung 26: LED-Stimulation der Trachea für ACh-Konzentrationsmessungen. ....	87
Abbildung 27: Schematische Darstellung der Isolation von Neuronen aus dem JNC. ....	89
Abbildung 28: Isolierte Zellen aus dem JNC von $\alpha 3$ -GFP-Mäusen. . ....	89
Abbildung 29: Schematische Darstellung des Versuchsablaufes der Messung der $[Ca^{2+}]_i$ von JNC-Neuronen. ....	91
Abbildung 30: Schematische Darstellung des Versuchsablaufes der Messung von M3-Reporterzellen. ....	92
Abbildung 31: Schematische Darstellung der Isolation und Kultivierung von <i>B. pseudohinzii</i> . ....	93
Abbildung 32: Schematische Darstellung der Infektionsexperimente mit <i>S. pneumoniae</i> ....	96
Abbildung 33: SCCC sind immunreaktiv für Proteine der Geschmackskaskade. ....	99
Abbildung 34: Chemosensorische Epithelzellen der Trachea der Maus. ....	100
Abbildung 35: Verteilung der SCCC in der Trachea. ....	101
Abbildung 36: In SCCC der Trachea von <i>ChAT</i> -eGFP Reporter-mäusen sind eGFP, ChAT, DCLK1 und TRPM5 co-lokalisiert. ....	103
Abbildung 37: Validierung der <i>Trpm5</i> -GFP-Reportermaus. ....	104
Abbildung 38: Charakterisierung der <i>Tas2r143</i> -mCherry-Reporter-mäuse, Zunge. ....	106
Abbildung 39: Charakterisierung der <i>Tas2r143</i> -mCherry-Reporter-mäuse, Trachea. ....	107
Abbildung 40: Charakterisierung der <i>ChAT-ChR2</i> -YFP-Mäuse. ....	109
Abbildung 41: Charakterisierung der <i>ChAT-ChR2</i> -YFP-Mäuse – Neurone. ....	110
Abbildung 42: Quantitative Auswertung der IHC an Tracheen von <i>ChAT-ChR2</i> -YFP-Mäusen. ....	110
Abbildung 43: IHC einer Harnblase einer <i>ChAT-ChR2</i> -YFP-Maus. ....	111
Abbildung 44: Charakterisierung der <i>Trpm5</i> -Ko-Mäuse, Teil 1. . ....	113
Abbildung 45: Charakterisierung der <i>Trpm5</i> -Ko Mäuse, Teil 2. ....	114
Abbildung 46: Charakterisierung der <i>Pou2f3</i> -Ko-Mäuse. ....	116
Abbildung 47: Charakterisierung der <i>M3R</i> -Ko-Mäuse. ....	118
Abbildung 48: Charakterisierung der <i>Tas2r</i> -Ko-Mauslinie. ....	119
Abbildung 49: Charakterisierung der <i>Trpm5</i> -DTA-Mäuse. ....	121
Abbildung 50: Anzahl der SCCC in Tracheen von <i>ChaT</i> -eGFP-Mäusen. ....	124
Abbildung 51: SCC in Embryonen von <i>ChAT</i> -eGFP-Reporter-mäusen. ....	125
Abbildung 52: Co-Expression von ChAT-eGFP und TRPM5 in Tracheen von <i>ChAT</i> -eGFP-Mäusen. ....	126
Abbildung 53: Anzahl von SCCC in „keimfreien Mäusen“. ....	128
Abbildung 54: Anzahl von SCCC in Tracheen von <i>Tlr</i> - und <i>Myd88</i> -defizienten Mäusen. ...	130
Abbildung 55: Veränderung der PTS nach Applikation von FPR-Agonisten und formylierten bakteriellen Signalpeptiden. ....	131

Abbildung 56: Veränderung der PTS nach Applikation von f-MKKFRW oder Varianten dieses Signalpeptides. ....	134
Abbildung 57: Veränderung der CBF nach Applikation von f-MKKFRW. ....	135
Abbildung 58: Expression von Fpr in der Trachea der Maus.....	138
Abbildung 59: Expression von Fpr in mittels FACS isolierten trachealen Epithelzellen der Maus. ....	139
Abbildung 60: Expression des Fpr3 im VNO der Maus, aber nicht in der Trachea. ....	140
Abbildung 61: Veränderung der PTS nach Applikation von f-MKKFRW in Abhängigkeit von Fpr. ....	141
Abbildung 62: Veränderung der PTS nach Applikation von f-MKKFRW und f-MKKFKWSI in Abhängigkeit von SCCC. ....	143
Abbildung 63: Veränderung der PTS nach Applikation von f-MKKFRW in Abhängigkeit von Komponenten der Geschmackstransduktionskaskade. ....	145
Abbildung 64: Veränderung der PTS in Abhängigkeit der Geschmacksrezeptoren Tas1r3, Tas1r1 und Tas1r2. ....	147
Abbildung 65: Einfluss von Bitterstoffen auf die PTS; Teil 1. ....	149
Abbildung 66: Einfluss von Bitterstoffen auf die PTS und Abhängigkeit von SCCC; Teil 2. ....	152
Abbildung 67: Veränderung der PTS durch f-MKKFRW in Abhängigkeit der Geschmacksrezeptoren Tas2r143,135,126. ....	154
Abbildung 68: Kontraktionsmessungen an explantierten Harnblasen in Abhängigkeit der Geschmacksrezeptoren Tas2r143,135,126. ....	155
Abbildung 69: ACh-Freisetzung nach Applikation von f-MKKFRW. ....	157
Abbildung 70: Validierung der den muskarinischen Rezeptor 3 exprimierenden Reporterzellen (M3-Reporterzellen) als geeignetes Modell zur Bestimmung der ACh-Konzentration in trachealen Überständen.....	159
Abbildung 71: Messungen der $[Ca^{2+}]_i$ von M3-Reporterzellen zur Bestimmung der ACh-Konzentration in trachealen Überständen. ....	162
Abbildung 72: Auswertung der in Abbildung 71 dargestellten Experimente. ....	164
Abbildung 73: ACh-Freisetzung nach optogenetischer Stimulation.....	167
Abbildung 74: Veränderung der PTS durch f-MKKFRW und Muskarin in <i>Avil<sup>cre</sup>-ChAT<sup>fl</sup></i> -Mäusen. ....	168
Abbildung 75: Veränderung der PTS durch f-MKKFRW und dessen Varianten in Abhängigkeit von muskarinischen ACh-Rezeptoren. ....	171
Abbildung 76: Veränderung der PTS durch f-MKKFRW in Abhängigkeit des Gasotransmitters NO. ....	173
Abbildung 77: Beteiligung sensorischer Nervenfasern an der Erhöhung der PTS durch f-MKKFRW. ....	175

Abbildung 78: Veränderung der PTS durch Überstände von MgrB-überexprimierenden *E. coli* in Abhängigkeit von SCCC. ....178

Abbildung 79: Semiquantitative Auswertung der Kolonisation mit *B. pseudohinzii* in *Trpm5*-Ko- und Kontrolltieren. ....180

Abbildung 80: Infektionsexperimente mit *S. pneumoniae* an *Trpm5*-DTA-Tieren. ....182

Abbildung 81: Histologische Untersuchungen der Lungen aus den Infektionsversuchen mit *S. pneumoniae* an *Trpm5*-DTA-Tieren. ....185

Abbildung 82: Immunhistochemische Markierungen mit Antikörpern gegen *S. pneumoniae* an Lungen aus den Infektionsversuchen. ....187

Abbildung 83: Anzahl an SCCC nach Infektion mit *S. pneumoniae*. ....188

Abbildung 84: Potentielle Signalwege für die Erhöhung der SCCC-Anzahl durch TLR-Agonisten im Trachealepithel der Maus.....194

Abbildung 85: Schematische Darstellung der afferenten Innervation der Trachea der Maus. ....206

Abbildung 86: Schematische Darstellung der Angriffspunkte der durchgeführten Versuche. ....207

Abbildung 87: Schematische Darstellung des postulierten Signalweges der ACh-Freisetzung aus trachealen SCCC der Maus, nach Stimulation mit formylierten Peptiden bakteriellen Ursprungs mit dem Kernmotiv f-MKKFRW. . ....218

## 9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Lokalisation von SCC im Menschen und in der Maus. ....	29
Tabelle 2: Verwendete Chemikalien, Medien und Reagenzien. ....	45
Tabelle 3: Verwendete Pharmaka und Narkotika. ....	49
Tabelle 4: Verwendete Peptide, deren Bezugsquelle und von dem Hersteller angegebene Reinheit. ....	51
Tabelle 5: Verwendete Geräte, deren Hersteller und Verwendungszweck. ....	53
Tabelle 6: Verwendete Computerprogramme deren Hersteller und die Homepage von der die Software bezogen werden kann. ....	55
Tabelle 7: Verwendete Primärantikörper für die Immunfluoreszenzmarkierung. ....	56
Tabelle 8: Verwendete Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenzmarkierung. ....	57
Tabelle 9: Verwendete Antikörper für FACS-Experimente. ....	57
Tabelle 10: Verwendete <i>Primer</i> für die RT-PCR oder Genotypisierung. ....	58
Tabelle 11: C1-Puffer zur Lösung der Peptide. ....	59
Tabelle 12: Puffer und Lösungen für die Gewebefixierung und Immunhistochemie. ....	60
Tabelle 13: Puffer und Lösungen für die FACS-Experimente. ....	61
Tabelle 14: Puffer für die Gelelektrophorese. ....	61
Tabelle 15: Hepes-Puffer für die Partikeltransport- und Zilienschlagmessungen. ....	61
Tabelle 16: Locke-Puffer für die Messung der $[Ca^{2+}]_i$ in Neuronen des JNC und M3- Reporterzellen. ....	62
Tabelle 17: Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Mauslinien, deren Stammbezeichnung, Erstbeschreibung, Ort der Haltung sowie Genehmigungsnummer der jeweiligen Behörde. ....	63
Tabelle 18: Reaktionsmix für die PCR zur Genotypisierung. ....	75
Tabelle 19: PCR-Protokoll für die Genotypisierung. ....	75
Tabelle 20: cDNA-Synthese-Mastermix für Gewebe und Blut. ....	78
Tabelle 21: cDNA-Synthese-Mastermix für isolierte tracheale Epithelzellen. ....	79
Tabelle 22: Reaktionsmix für die PCR. ....	80
Tabelle 23: PCR-Protokoll. ....	80
Tabelle 24: <i>In silico</i> -Analyse der Gensequenzen von Bakterien. ....	133
Tabelle 25: <i>In silico</i> -Analyse der Gensequenzen von Pathogenen. ....	136
Tabelle 26: Tabellarische Zusammenfassung der Tas2R, welche in murinen trachealen SCCC nachgewiesen wurden, und deren bekannten Agonisten und deren Effekt auf die PTS. .....	215

## 10. Literaturverzeichnis

**Adachi O., Kawai T., Takeda K., Matsumoto M., Tsutsui H., Sakagami M., Nakanishi K., Akira S. (1998):** Targeted Disruption of the MyD88 Gene Results in Loss of IL-1- and IL-18-Mediated Function. *Immunity* 9 (1), S. 143–150.

**Akira S., Takeda K. (2004):** Toll-like receptor signalling. *Nature reviews. Immunology* 4 (7), S. 499–511.

**Arp L. H., Cheville N. F. (1984):** Tracheal lesions in young turkeys infected with *Bordetella avium*. *American journal of veterinary research* 45 (10), S. 2196–2200.

**Atanasova K. R., Reznikov L. R. (2018):** Neuropeptides in asthma, chronic obstructive pulmonary disease and cystic fibrosis. *Respiratory research* 19 (1), S. 149.

**Atanasova K. R., Reznikov L. R. (2019):** Strategies for measuring airway mucus and mucins. *Respiratory research* 20 (1), S. 261.

**Aznaourova M., Schmerer N., Schmeck B., Schulte L. N. (2020):** Disease-Causing Mutations and Rearrangements in Long Non-coding RNA Gene Loci. *Frontiers in genetics* 11, S. 527484.

**Bailey K. L., LeVan T. D., Yanov D. A., Pavlik J. A., DeVasure J. M., Sisson J. H., Wyatt T. A. (2012):** Non-typeable *Haemophilus influenzae* decreases cilia beating via protein kinase C $\epsilon$ . *Respiratory research* 13, S. 49.

**Baker P. F., Glitsch H. G. (1975):** Voltage-dependent changes in the permeability of nerve membranes to calcium and other divalent cations. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 270 (908), S. 389–409.

**Baldin J.-P., Barth D., Fronius M. (2020):** Epithelial Na<sup>+</sup> Channel (ENaC) Formed by One or Two Subunits Forms Functional Channels That Respond to Shear Force. *Frontiers in physiology* 11, S. 141.

**Balentova S., Conwell S., Myers A. C. (2013):** Neurotransmitters in parasympathetic ganglionic neurons and nerves in mouse lower airway smooth muscle. *Respiratory physiology & neurobiology* 189 (1), S. 195–202.

**Banerjee A., Herring C. A., Chen B., Kim H., Simmons A. J., Southard-Smith A. N., Allaman M. M., White J. R., Macedonia M. C., McKinley E. T., Solano M. A. R., Scoville E. A., Liu Q., Wilson K. T., Coffey R. J., Washington M. K., Goettel J. A., Lau K. S. (2020):** Succinate Produced by Intestinal Microbes Promotes Specification of Tuft Cells to Suppress Ileal Inflammation. *Gastroenterology* 159 (6), 2101-2115.e5.

- Bankova L. G., Dwyer D. F., Yoshimoto E., Ualiyeva S., McGinty J. W., Raff H., Moltke J. von, Kanaoka Y., Frank Austen K., Barrett N. A. (2018):** The cysteinyl leukotriene 3 receptor regulates expansion of IL-25-producing airway brush cells leading to type 2 inflammation. *Science immunology* 3 (28).
- Baxter B. D., Larson E. D., Merle L., Feinstein P., Polese A. G., Bubak A. N., Niemeyer C. S., Hassell J., Shepherd D., Ramakrishnan V. R., Nagel M. A., Restrepo D. (2021):** Transcriptional profiling reveals potential involvement of microvillous TRPM5-expressing cells in viral infection of the olfactory epithelium. *BMC genomics* 22.
- Becher Carstens P. H., Broghamer W. L., Hire D. (1976):** Malignant fibrillocaveolated cell carcinoma of the human intestinal tract. *Human Pathology* 7 (5), S. 505–517.
- Becker M. N., Diamond G., Verghese M. W., Randell S. H. (2000):** CD14-dependent lipopolysaccharide-induced beta-defensin-2 expression in human tracheobronchial epithelium. *The Journal of biological chemistry* 275 (38), S. 29731–29736.
- Behrens M., Meyerhof W. (2013):** Bitter taste receptor research comes of age: from characterization to modulation of TAS2Rs. *Seminars in cell & developmental biology* 24 (3), S. 215–221.
- Bemis D. A., Carmichael L. E., Appel M. J. (1977):** Naturally occurring respiratory disease in a kennel caused by *Bordetella bronchiseptica*. *The Cornell veterinarian* 67 (2), S. 282–293.
- Berger S., Goekeri C., Gupta S. K., Vera J., Dietert K., Behrendt U., Lienau J., Wienhold S.-M., Gruber A. D., Suttrop N., Witzernath M., Nouailles G. (2018):** Delay in antibiotic therapy results in fatal disease outcome in murine pneumococcal pneumonia. *Critical care* 22 (1), S. 287.
- Besnard P., Passilly-Degrace P., Khan N. A. (2016):** Taste of Fat: A Sixth Taste Modality? *Physiological reviews* 96 (1), S. 151–176.
- Bezençon C., Fürholz A., Raymond F., Mansourian R., Métairon S., Le Coutre J., Damak S. (2008):** Murine intestinal cells expressing *Trpm5* are mostly brush cells and express markers of neuronal and inflammatory cells. *The Journal of comparative neurology* 509 (5), S. 514–525.
- Billipp T. E., Nadsombati M. S., Moltke J. von (2021):** Tuning tuft cells: new ligands and effector functions reveal tissue-specific function. *Current opinion in immunology* 68, S. 98–106.
- Bloomquist E. I., Kream R. M. (1990):** Release of substance P from guinea pig trachea leukotriene D4. *Experimental lung research* 16 (6), S. 645–659.
- Boillat M., Carleton A., Rodriguez I. (2021):** From immune to olfactory expression: neofunctionalization of formyl peptide receptors. *Cell and tissue research* 383 (1), S. 387–393.

- Botos I., Segal D. M., Davies D. R. (2011):** The structural biology of Toll-like receptors. *Structure* 19 (4), S. 447–459.
- Boucher R. C. (2004):** New concepts of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *The European respiratory journal* 23 (1), S. 146–158.
- Brockschneider D., Pechmann Y., Sonnenberg-Riethmacher E., Riethmacher D. (2006):** An improved mouse line for Cre-induced cell ablation due to diphtheria toxin A, expressed from the Rosa26 locus. *Genesis*, S. 322–327.
- Brown T. C., Bond C. E., Hoover D. B. (2018):** Variable expression of GFP in different populations of peripheral cholinergic neurons of ChATBAC-eGFP transgenic mice. *Autonomic neuroscience: basic & clinical* 210, S. 44–54.
- Bufe B., Schumann T., Kappl R., Bogeski I., Kummerow C., Podgórska M., Smola S., Hoth M., Zufall F. (2015):** Recognition of bacterial signal peptides by mammalian formyl peptide receptors: a new mechanism for sensing pathogens. *The Journal of biological chemistry* 290 (12), S. 7369–7387.
- Bufe B., Schumann T., Zufall F. (2012):** Formyl peptide receptors from immune and vomeronasal system exhibit distinct agonist properties. *The Journal of biological chemistry* 287 (40), S. 33644–33655.
- Bufe B., Teuchert Y., Schmid A., Pyrski M., Pérez-Gómez A., Eisenbeis J., Timm T., Ishii T., Lochnit G., Bischoff M., Mombaerts P., Leinders-Zufall T., Zufall F. (2019):** Bacterial MgrB peptide activates chemoreceptor Fpr3 in mouse accessory olfactory system and drives avoidance behaviour. *Nature communications* 10 (1), S. 4889.
- Bufe B., Zufall F. (2016):** The sensing of bacteria: emerging principles for the detection of signal sequences by formyl peptide receptors. *Biomolecular concepts* 7 (3), S. 205–214.
- Bustamante-Marin X. M., Ostrowski L. E. (2017):** Cilia and Mucociliary Clearance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 9 (4), a028241.
- Bylund J., Samuelsson M., Collins L. V., Karlsson A. (2003):** NADPH-oxidase activation in murine neutrophils via formyl peptide receptors. *Experimental cell research* 282 (2), S. 70–77.
- Cadieux A., Springall D. R., Mulderry P. K., Rodrigo J., Ghatei M. A., Terenghi G., Bloom S. R., Polak J. M. (1986):** Occurrence, distribution and ontogeny of CGRP immunoreactivity in the rat lower respiratory tract: effect of capsaicin treatment and surgical denervations. *Neuroscience* 19 (2), S. 605–627.
- Canessa C. M., Schild L., Buell G., Thorens B., Gautschi I., Horisberger J. D., Rossier B. C. (1994):** Amiloride-sensitive epithelial Na<sup>+</sup> channel is made of three homologous subunits. *Nature* 367 (6462), S. 463–467.

- Canning B. J. (2011):** Functional implications of the multiple afferent pathways regulating cough. *Pulmonary pharmacology & therapeutics* 24 (3), S. 295–299.
- Carey R. M., Lee R. J. (2019):** Taste Receptors in Upper Airway Innate Immunity. *Nutrients* 11 (9).
- Carey R. M., Workman A. D., Yan C. H., Chen B., Adappa N. D., Palmer J. N., Kennedy D. W., Lee R. J., Cohen N. A. (2017):** Sinonasal T2R-mediated nitric oxide production in response to *Bacillus cereus*. *American journal of rhinology & allergy* 31 (4), S. 211–215.
- Cartoni C., Yasumatsu K., Ohkuri T., Shigemura N., Yoshida R., Godinot N., Le Coutre J., Ninomiya Y., Damak S. (2010):** Taste preference for fatty acids is mediated by GPR40 and GPR120. *Journal of Neuroscience* 30 (25), S. 8376–8382.
- Caulfield M. P. (1993):** Muscarinic Receptors—Characterization, coupling and function. *Pharmacology & Therapeutics* 58 (3), S. 319–379.
- Chang L. Y., Mercer R. R., Crapo J. D. (1986):** Differential distribution of brush cells in the rat lung. *The Anatomical record* 216 (1), S. 49–54.
- Chaudhari N., Landin A. M., Roper S. D. (2000):** A metabotropic glutamate receptor variant functions as a taste receptor. *Nature neuroscience* 3 (2), S. 113–119.
- Chaudhari N., Roper S. D. (2010):** The cell biology of taste. *The Journal of cell biology* 190 (3), S. 285–296.
- Chilvers M. A., O’Callaghan C. (2000):** Local mucociliary defence mechanisms. *Paediatric respiratory reviews* 1 (1), S. 27–34.
- Choppin A., Eglen R. M., Hegde S. S. (1998):** Pharmacological characterization of muscarinic receptors in rabbit isolated iris sphincter muscle and urinary bladder smooth muscle. *British journal of pharmacology* 124 (5), S. 883–888.
- Christopher A. B., Ochoa S., Krushansky E., Francis R., Tian X., Zahid M., Muñoz R., Lo C. W. (2014):** The effects of temperature and anesthetic agents on ciliary function in murine respiratory epithelia. *Frontiers in pediatrics* 2, S. 111.
- Christophersen L. J., Trøstrup H., Malling Damlund D. S., Bjarnsholt T., Thomsen K., Jensen P. Ø., Hougen H. P., Høiby N., Moser C. (2012):** Bead-size directed distribution of *Pseudomonas aeruginosa* results in distinct inflammatory response in a mouse model of chronic lung infection. *Clinical and experimental immunology* 170 (2), S. 222–230.
- Clapp T. R., Medler K. F., Damak S., Margolskee R. F., Kinnamon S. C. (2006):** Mouse taste cells with G protein-coupled taste receptors lack voltage-gated calcium channels and SNAP-25. *BMC biology* 4, S. 7.

- Clapp T. R., Stone L. M., Margolskee R. F., Kinnamon S. C. (2001):** Immunocytochemical evidence for co-expression of Type III IP3 receptor with signaling components of bitter taste transduction. *BMC neuroscience* 2, S. 6.
- Clark S. E., Purcell J. E., Bi X., Fortman J. D. (2017):** Cross-Foster Rederivation Compared with Antibiotic Administration in the Drinking Water to Eradicate *Bordetella pseudohinzii*. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* 56 (1), S. 47–51.
- Clark S. E., Purcell J. E., Sammani S., Steffen E. K., Crim M. J., Livingston R. S., Besch-Williford C., Fortman J. D. (2016):** *Bordetella pseudohinzii* as a Confounding Organism in Murine Models of Pulmonary Disease. *Comparative medicine* 66 (5), S. 361–366.
- Crystal, Ronald G. (1997):** The lung. Scientific foundations. 2. ed. Philadelphia, Pa. Lippincott-Raven.
- Cutz E., Conen P. E. (1972):** Endocrine-like cells in human fetal lungs: an electron microscopic study. *The Anatomical record* 173 (1), S. 115–122
- Cutz E., Pan J., Yeger H., Domnik N. J., Fisher J. T. (2013):** Recent advances and controversies on the role of pulmonary neuroepithelial bodies as airway sensors. *Seminars in cell & developmental biology* 24 (1), S. 40–50.
- Czapiga M., Gao J.-L., Kirk A., Lekstrom-Himes J. (2005):** Human platelets exhibit chemotaxis using functional N-formyl peptide receptors. *Experimental hematology* 33 (1), S. 73–84.
- Dagan-Wiener A., Di Pizio A., Nissim I., Bahia M. S., Dubovski N., Margulis E., Niv M. Y. (2019):** BitterDB: taste ligands and receptors database in 2019. *Nucleic acids research* 47 (D1), D1179-D1185.
- Damak S., Rong M., Yasumatsu K., Kokrashvili Z., Varadarajan V., Zou S., Jiang P., Ninomiya Y., Margolskee R. F. (2003):** Detection of sweet and umami taste in the absence of taste receptor T1r3. *Science* 301 (5634), S. 850–853.
- Darrah R., Bonfield T., LiPuma J. J., Litman P., Hodges C. A., Jacono F., Drumm M. (2017):** Cystic Fibrosis Mice Develop Spontaneous Chronic *Bordetella* Airway Infections. *Journal of infectious pulmonary diseases* 3 (2).
- Deckmann K., Filipski K., Krasteva-Christ G., Fronius M., Althaus M., Rafiq A., Papadakis T., Renno L., Jurastow I., Wessels L., Wolff M., Schütz B., Weihe E., Chubanov V., Gudermann T., Klein J., Bschiepfer T., Kummer W. (2014):** Bitter triggers acetylcholine release from polymodal urethral chemosensory cells and bladder reflexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (22), S. 8287–8292.

- Deckmann K., Krasteva-Christ G., Rafiq A., Herden C., Wichmann J., Knauf S., Nassenstein C., Grevelding C. G., Dorresteyn A., Chubanov V., Gudermann T., Bschiepfer T., Kummer W. (2015):** Cholinergic urethral brush cells are widespread throughout placental mammals. *International immunopharmacology* 29 (1), S. 51–56.
- Dedkova E. N., Sigova A. A., Zinchenko V. P. (2000):** Mechanism of action of calcium ionophores on intact cells: ionophore-resistant cells. *Membrane & cell biology* 13 (3), S. 357–368.
- Delay E. R., Hernandez N. P., Bromley K., Margolskee R. F. (2006):** Sucrose and monosodium glutamate taste thresholds and discrimination ability of T1R3 knockout mice. *Chemical senses* 31 (4), S. 351–357.
- Delneste Y., Beauvillain C., Jeannin P. (2007):** Immunité naturelle: structure et fonction des Toll-like receptors. *Medecine sciences: M/S* 23 (1), S. 67–73.
- Deshpande D. A., Wang W. C. H., McIlmoyle E. L., Robinett K. S., Schillinger R. M., An S. S., Sham J. S. K., Liggett S. B. (2010):** Bitter taste receptors on airway smooth muscle bronchodilate by localized calcium signaling and reverse obstruction. *Nature medicine* 16 (11), S. 1299–1304.
- Devalia J. L., Sapsford R. J., Rusznak C., Toubis M. J., Davies R. J. (1992):** The effects of salmeterol and salbutamol on ciliary beat frequency of cultured human bronchial epithelial cells, in vitro. *Pulmonary Pharmacology* 5 (4), S. 257–263.
- Dewan K. K., Taylor-Mulneix D. L., Campos L. L., Skarlupka A. L., Wagner S. M., Ryman V. E., Gestal M. C., Ma L., Blas-Machado U., Faddis B. T., Harvill E. T. (2019):** A model of chronic, transmissible Otitis Media in mice. *PLoS pathogens* 15 (4), e1007696.
- Dhawan S., Palma G. de, Willemze R. A., Hilbers F. W., Verseijden C., Luyer M. D., Nuding S., Wehkamp J., Souwer Y., Jong E. C. de, Seppen J., van den Wijngaard R. M., Wehner S., Verdu E., Bercik P., Jonge W. J. de (2016):** Acetylcholine-producing T cells in the intestine regulate antimicrobial peptide expression and microbial diversity. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 311 (5), G920-G933.
- Dietert K., Gutbier B., Wienhold S. M., Reppe K., Jiang X., Yao L., Chaput C., Naujoks J., Brack M., Kupke A., Peteranderl C., Becker S., Lachner C. von, Baal N., Slevogt H., Hocke A. C., Witzernath M., Opitz B., Herold S., Hackstein H., Sander L. E., Suttorp N., Gruber A. D. (2017):** Spectrum of pathogen- and model-specific histopathologies in mouse models of acute pneumonia. *PloS one* 12 (11), e0188251.

- Dietert K., Reppe K., Mundhenk L., Witzenrath M., Gruber A. D. (2014):** mCLCA3 modulates IL-17 and CXCL-1 induction and leukocyte recruitment in murine *Staphylococcus aureus* pneumonia. *PLoS one* 9 (7), e102606.
- Do B. H., Ohbuchi T., Wakasugi T., Koizumi H., Yokoyama M., Hohchi N., Suzuki H. (2018):** Acetylcholine-induced Ciliary Beat of the Human Nasal Mucosa Is Regulated by the Pannexin-1 Channel and Purinergic P2X Receptor. *American journal of rhinology & allergy* 32 (4), S. 217–227.
- Doherty T. A., Khorram N., Lund S., Mehta A. K., Croft M., Broide D. H. (2013):** Lung type 2 innate lymphoid cells express cysteinyl leukotriene receptor 1, which regulates TH2 cytokine production. *The Journal of allergy and clinical immunology* 132 (1), S. 205–213.
- Drenckhahn, D. (2008):** Zellen- und Gewebelehre, Entwicklungslehre, Skelett- und Muskelsystem, Atemsystem, Verdauungssystem, Harn- und Genitalsystem. Unter Mitarbeit von Bodo Christ. Elsevier Urban & Fischer. 17., Elsevier (Anatomie, makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie / Benninghoff; Drenckhahn; Bd. 1).
- Droguett K., Rios M., Carreño D. V., Navarrete C., Fuentes C., Villalón M., Barrera N. P. (2017):** An autocrine ATP release mechanism regulates basal ciliary activity in airway epithelium. *The Journal of physiology* 595 (14), S. 4755–4767.
- Duszyk M. (2001):** CFTR and lysozyme secretion in human airway epithelial cells. *Pflugers Archiv: European journal of physiology* 443 Suppl 1, S45-9.
- Dutta Banik D., Martin L. E., Freichel M., Torregrossa A.-M., Medler K. F. (2018):** TRPM4 and TRPM5 are both required for normal signaling in taste receptor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115 (4), E772-81.
- Eberl G., Colonna M., Di Santo J. P., McKenzie A. N. (2015):** Innate Lymphoid Cells: a new paradigm in immunology. *Science* 348 (6237), aaa6566.
- Edwards J. A., Groathouse N. A., Boitano S. (2005):** *Bordetella bronchiseptica* adherence to cilia is mediated by multiple adhesin factors and blocked by surfactant protein A. *Infection and immunity* 73 (6), S. 3618–3626.
- Eljamal M., Wong L. B., Yeates D. B. (1994):** Capsaicin-activated bronchial- and alveolar-initiated pathways regulating tracheal ciliary beat frequency. *Journal of applied physiology* 77 (3), S. 1239–1245.
- El-Zayat S. R., Sibaii H., Mannaa F. A. (2019):** Toll-like receptors activation, signaling, and targeting: an overview. *Bulletin of the National Research Centre* 43 (1), S. 48.

- Engelhardt J. von, Eliava M., Meyer A. H., Rozov A., Monyer H. (2007):** Functional characterization of intrinsic cholinergic interneurons in the cortex. *Journal of Neuroscience* 27 (21), S. 5633–5642.
- Engler A. E., Ysasi A. B., Pihl R. M. F., Villacorta-Martin C., Heston H. M., Richardson H. M. K., Thapa B. R., Moniz N. R., Belkina A. C., Mazzilli S. A., Rock J. R. (2020):** Airway-Associated Macrophages in Homeostasis and Repair. *Cell reports* 33 (13), S. 108553.
- Ericson L. E., Håkanson R., Larson B., Owman C., Sundler F. (1972):** Fluorescence and electron microscopy of amine-storing enterochromaffin-like cells in tracheal epithelium of mouse. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie* 124 (4), S. 532–545.
- Evans J. H., Sanderson M. J. (1999):** Intracellular calcium oscillations regulate ciliary beat frequency of airway epithelial cells. *Cell calcium* 26 (3-4), S. 103–110
- Facchini M., Fino I. de, Riva C., Bragonzi A. (2014):** Long term chronic *Pseudomonas aeruginosa* airway infection in mice. *Journal of visualized experiments* (85).
- Fahy J. V., Dickey B. F. (2010):** Airway mucus function and dysfunction. *The New England journal of medicine* 363 (23), S. 2233–2247.
- Faith J. J., Ahern P. P., Ridaura V. K., Cheng J., Gordon J. I. (2014):** Identifying gut microbe-host phenotype relationships using combinatorial communities in gnotobiotic mice. *Science translational medicine* 6 (220), 220ra11.
- Finger T. E., Böttger B., Hansen A., Anderson K. T., Alimohammadi H., Silver W. L. (2003):** Solitary chemoreceptor cells in the nasal cavity serve as sentinels of respiration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (15), S. 8981–8986.
- Finger T. E., Danilova V., Barrows J., Bartel D. L., Vigers A. J., Stone L., Hellekant G., Kinnamon S. C. (2005):** ATP signaling is crucial for communication from taste buds to gustatory nerves. *Science* 310 (5753), S. 1495–1499.
- Finger T. E., Kinnamon S. C. (2011):** Taste isn't just for taste buds anymore. *F1000 biology reports* 3, S. 20.
- Flemming A. (1922):** On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions. *Proceedings of the Royal Society B* 93 (653), S. 306–317.
- Fliegau M., Sonnen A. F.-P., Kremer B., Henneke P. (2013):** Mucociliary clearance defects in a murine in vitro model of pneumococcal airway infection. *PloS one* 8 (3), e59925.

**Forsman H., Önnheim K., Andréasson E., Christenson K., Karlsson A., Bylund J., Dahlgren C. (2013):** Reactivation of desensitized formyl peptide receptors by platelet activating factor: a novel receptor cross talk mechanism regulating neutrophil superoxide anion production. *PLoS one* 8 (3), e60169.

**Frahm S., Slimak M. A., Ferrarese L., Santos-Torres J., Antolin-Fontes B., Auer S., Filkin S., Pons S., Fontaine J.-F., Tsetlin V., Maskos U., Ibañez-Tallon I. (2011):** Aversion to nicotine is regulated by the balanced activity of  $\beta 4$  and  $\alpha 5$  nicotinic receptor subunits in the medial habenula. *Neuron* 70 (3), S. 522–535.

**Francis R. J. B., Chatterjee B., Loges N. T., Zentgraf H., Omran H., Lo C. W. (2009):** Initiation and maturation of cilia-generated flow in newborn and postnatal mouse airway. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 296 (6), L1067-75.

**Freund J. R., Mansfield C. J., Doghramji L. J., Adappa N. D., Palmer J. N., Kennedy D. W., Reed D. R., Jiang P., Lee R. J. (2018):** Activation of airway epithelial bitter taste receptors by *Pseudomonas aeruginosa* quinolones modulates calcium, cyclic-AMP, and nitric oxide signaling. *The Journal of biological chemistry* 293 (25), S. 9824–9840.

**Fu Y., Tong J., Meng F., Hoeltig D., Liu G., Yin X., Herrler G. (2018):** Ciliostasis of airway epithelial cells facilitates influenza A virus infection. *Veterinary research* 49 (1), S. 65.

**Futatsugi A., Nakamura T., Yamada M. K., Ebisui E., Nakamura K., Uchida K., Kitaguchi T., Takahashi-Iwanaga H., Noda T., Aruga J., Mikoshiba K. (2005):** IP3 receptor types 2 and 3 mediate exocrine secretion underlying energy metabolism. *Science* 309 (5744), S. 2232–2234.

**Galli S. J., Nakae S., Tsai M. (2005):** Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nature immunology* 6 (2), S. 135–142.

**Ganesan S., Comstock A. T., Sajjan U. S. (2013):** Barrier function of airway tract epithelium. *Tissue barriers* 1 (4), e24997.

**Ganz T. (2002):** Antimicrobial polypeptides in host defense of the respiratory tract. *Journal of Clinical Investigation* 109 (6), S. 693–697.

**Gao J. L., Chen H., Filie J. D., Kozak C. A., Murphy P. M. (1998):** Differential expansion of the N-formylpeptide receptor gene cluster in human and mouse. *Genomics* 51 (2), S. 270–276.

**Gao J. L., Lee E. J., Murphy P. M. (1999):** Impaired antibacterial host defense in mice lacking the N-formylpeptide receptor. *The Journal of experimental medicine* 189 (4), S. 657–662.

**Gebhard A., Gebert A. (1999):** Brush cells of the mouse intestine possess a specialized glycocalyx as revealed by quantitative lectin histochemistry. Further evidence for a sensory function. *The journal of histochemistry and cytochemistry* 47 (6), S. 799–808.

**Gerbe F., Brulin B., Makrini L., Legraverend C., Jay P. (2009):** DCAMKL-1 expression identifies Tuft cells rather than stem cells in the adult mouse intestinal epithelium. *Gastroenterology* 137 (6), 2179-80.

**Gerbe F., Sidot E., Smyth D. J., Ohmoto M., Matsumoto I., Dardalhon V., Cesses P., Garnier L., Pouzolles M., Brulin B., Bruschi M., Harcus Y., Zimmermann V. S., Taylor N., Maizels R. M., Jay P. (2016):** Intestinal epithelial tuft cells initiate type 2 mucosal immunity to helminth parasites. *Nature* 529 (7585), S. 226–230.

**Giangreco A., Lu L., Mazzatti D. J., Spencer-Dene B., Nye E., Teixeira V. H., Janes S. M. (2011):** Myd88 deficiency influences murine tracheal epithelial metaplasia and submucosal gland abundance. *The Journal of pathology* 224 (2), S. 190–202.

**Go Y., Satta Y., Takenaka O., Takahata N. (2005):** Lineage-specific loss of function of bitter taste receptor genes in humans and nonhuman primates. *Genetics* 170 (1), S. 313–326.

**Gödecke A., Decking U. K., Ding Z., Hirchenhain J., Bidmon H. J., Gödecke S., Schrader J. (1998):** Coronary hemodynamics in endothelial NO synthase knockout mice. *Circulation research* 82 (2), S. 186–194.

**Gor D. O., Ding X., Briles D. E., Jacobs M. R., Greenspan N. S. (2005):** Relationship between Surface Accessibility for PpmA, PsaA, and PspA and Antibody-Mediated Immunity to Systemic Infection by *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and immunity* 73 (3), S. 1304–1312.

**Gould V. E., Yannopoulos A. D., Sommers S. C., Terzakis J. A. (1978):** Neuroendocrine cells in dysplastic bronchi: ultrastructural observations and quantitative analysis of secretory granules and the golgi complex. *The American journal of pathology* 90 (1), S. 49–56.

**Greene C. M., McElvaney N. G. (2005):** Toll-like receptor expression and function in airway epithelial cells. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis* 53 (5), S. 418–427.

**Haeggström J. Z., Funk C. D. (2011):** Lipoxygenase and leukotriene pathways: biochemistry, biology, and roles in disease. *Chemical reviews* 111 (10), S. 5866–5898.

**Hagan J. J., van der Heijden B., Broekkamp C. L. (1988):** The relative potencies of cholinomimetics and muscarinic antagonists on the rat iris in vivo: effects of pH on potency of pirenzepine and telenzepine. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 338 (5), S. 476–483.

- Hansell M. M., Moretti R. L. (1969):** Ultrastructure of the mouse tracheal epithelium. *Journal of morphology* 128 (2), S. 159–169.
- Hattori S., Matsuda M., Tateishi R., Nishihara H., Horai T. (1972):** Oat-cell carcinoma of the lung. Clinical and morphological studies in relation to its histogenesis. *Cancer* 30 (4), S. 1014–1024.
- Hawkins F. J., Kotton D. N. (2018):** Pulmonary Ionocytes Challenge the Paradigm in Cystic Fibrosis. *Trends in pharmacological sciences* 39 (10), S. 852–854.
- He W., Miao F. J.-P., Lin D. C.-H., Schwandner R. T., Wang Z., Gao J., Chen J.-L., Tian H., Ling L. (2004):** Citric acid cycle intermediates as ligands for orphan G-protein-coupled receptors. *Nature* 429 (6988), S. 188–193.
- Heck G. L., Mierson S., DeSimone J. A. (1984):** Salt taste transduction occurs through an amiloride-sensitive sodium transport pathway. *Science* 223 (4634), S. 403–405.
- Hedberg M. L., Goh G., Chiosea S. I., Bauman J. E., Freilino M. L., Zeng Y., Wang L., Diergaard B. B., Gooding W. E., Lui V. W. Y., Herbst R. S., Lifton R. P., Grandis J. R. (2016):** Genetic landscape of metastatic and recurrent head and neck squamous cell carcinoma. *The Journal of clinical investigation* 126 (4), S. 1606.
- Herbert M. K., Holzer P. (2002):** Die neurogene Entzündung. II. Pathophysiologie und klinische Implikationen. *Anesthesiologie, Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie*: 37 (7), S. 386–394.
- Hiemstra P. S., McCray P. B., Bals R. (2015):** The innate immune function of airway epithelial cells in inflammatory lung disease. *The European respiratory journal* 45 (4), S. 1150–1162.
- Hirata K., Dufour J.-F., Shibao K., Knickelbein R., O’Neill A. F., Bode H.-P., Cassio D., St-Pierre M. V., Larusso N. F., Leite M. F., Nathanson M. H. (2002):** Regulation of Ca<sup>(2+)</sup> signaling in rat bile duct epithelia by inositol 1,4,5-trisphosphate receptor isoforms. *Hepatology* 36 (2), S. 284–296.
- HODGKIN A. L., HUXLEY A. F. (1952):** Propagation of electrical signals along giant nerve fibers. *Proceedings of the Royal Society B* 140 (899), S. 177–183.
- Höfer D., Püschel B., Drenckhahn D. (1996):** Taste receptor-like cells in the rat gut identified by expression of alpha-gustducin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (13), S. 6631–6634.

- Hollenhorst M. I., Jurastow I., Nandigama R., Appenzeller S., Li L., Vogel J., Wiederhold S., Althaus M., Empting M., Altmüller J., Hirsch A. K. H., Flockerzi V., Canning B. J., Saliba A.-E., Krasteva-Christ G. (2020):** Tracheal brush cells release acetylcholine in response to bitter tastants for paracrine and autocrine signaling. *FASEB journal* 34 (1), S. 316–332.
- Hollenhorst M. I., Lips K. S., Weitz A., Krasteva G., Kummer W., Fronius M. (2012):** Evidence for functional atypical nicotinic receptors that activate K<sup>+</sup>-dependent Cl<sup>-</sup> secretion in mouse tracheal epithelium. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 46 (1), S. 106–114.
- Hollenhorst M. I., Richter K., Fronius M. (2011):** Ion transport by pulmonary epithelia. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2011, S. 174306.
- Holzer P. (1988):** Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: Involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. *Neuroscience* 24 (3), S. 739–768.
- Hong K. U., Reynolds S. D., Watkins S., Fuchs E., Stripp B. R. (2004):** Basal cells are a multipotent progenitor capable of renewing the bronchial epithelium. *The American journal of pathology* 164 (2), S. 577–588.
- Horio N., Yoshida R., Yasumatsu K., Yanagawa Y., Ishimaru Y., Matsunami H., Ninomiya Y. (2011):** Sour taste responses in mice lacking PKD channels. *PLoS one* 6 (5), e20007.
- Howitt M. R., Cao Y. G., Gologorsky M. B., Li J. A., Haber A. L., Biton M., Lang J., Michaud M., Regev A., Garrett W. S. (2020):** The Taste Receptor TAS1R3 Regulates Small Intestinal Tuft Cell Homeostasis. *ImmunoHorizons* 4 (1), S. 23–32.
- Howitt M. R., Lavoie S., Michaud M., Blum A. M., Tran S. V., Weinstock J. V., Gallini C. A., Redding K., Margolskee R. F., Osborne L. C., Artis D., Garrett W. S. (2016):** Tuft cells, taste-chemosensory cells, orchestrate parasite type 2 immunity in the gut. *Science* 351 (6279), S. 1329–1333.
- Hua X.-Y., Yaksh T. L. (1992):** Release of calcitonin gene-related peptide and tachykinins from the rat trachea. *Peptides* 13 (1), S. 113–120.
- Huang A. L., Chen X., Hoon M. A., Chandrashekar J., Guo W., Tränkner D., Ryba N. J. P., Zuker C. S. (2006):** The cells and logic for mammalian sour taste detection. *Nature* 442 (7105), S. 934–938.
- Hussong J., Lindken R., Faulhammer P., Noreikat K., Sharp K. V., Kummer W., Westerweel J. (2013):** Cilia-driven particle and fluid transport over mucus-free mice tracheae. *Journal of biomechanics* 46 (3), S. 593–598.

- Ioannidis I., Ye F., McNally B., Willette M., Flaño E. (2013):** Toll-like receptor expression and induction of type I and type III interferons in primary airway epithelial cells. *Journal of virology* 87 (6), S. 3261–3270.
- Iseki S. (1991):** Postnatal development of the brush cells in the common bile duct of the rat. *Cell and tissue research* 266 (3), S. 507–510.
- Ishimaru Y., Inada H., Kubota M., Zhuang H., Tominaga M., Matsunami H. (2006):** Transient receptor potential family members PKD1L3 and PKD2L1 form a candidate sour taste receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (33), S. 12569–12574.
- Ivanov Y. V., Linz B., Register K. B., Newman J. D., Taylor D. L., Boschert K. R., Le Guyon S., Wilson E. F., Brinkac L. M., Sanka R., Greco S. C., Klender P. M., Losada L., Harvill E. T. (2016):** Identification and taxonomic characterization of *Bordetella pseudohinzii* sp. nov. isolated from laboratory-raised mice. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 66 (12), S. 5452–5459.
- Jackowski J. T., Szepfalusi Z., Wanner D. A., Seybold Z., Sielczak M. W., Lauredo I. T., Adams T., Abraham W. M., Wanner A. (1991):** Effects of *P. aeruginosa*-derived bacterial products on tracheal ciliary function: role of O<sub>2</sub> radicals. *The American journal of physiology* 260 (2 Pt 1), L61-7.
- Jagdmann S., Berchtold D., Gutbier B., Witzenrath M., Meisel A., Meisel C., Dames C. (2021):** Efficacy and safety of intratracheal IFN- $\gamma$  treatment to reverse stroke-induced susceptibility to pulmonary bacterial infections. *Journal of Neuroimmunology* 355, S. 577568.
- Janeway C., Travers P. (2005):** Immunobiology. The immune system in health and disease; 6. ed. Garland Science.
- Jiang H., Kuang Y., Wu Y., Xie W., Simon M. I., Wu D. (1997):** Roles of phospholipase C beta2 in chemoattractant-elicited responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (15), S. 7971–7975.
- Jiao J., Wang H., Lou W., Jin S., Fan E., Li Y., Han D., Zhang L. (2011):** Regulation of ciliary beat frequency by the nitric oxide signaling pathway in mouse nasal and tracheal epithelial cells. *Experimental cell research* 317 (17), S. 2548–2553
- Kaske S., Krasteva G., König P., Kummer W., Hofmann T., Gudermann T., Chubanov V. (2007):** TRPM5, a taste-signaling transient receptor potential ion-channel, is a ubiquitous signaling component in chemosensory cells. *BMC neuroscience* 8, S. 49.
- Kawamata S., Fujita H. (1983):** Fine structural aspects of the development and aging of the tracheal epithelium of mice. *Archivum histologicum Japonicum* 46 (3), S. 355–372.

- Kawasaki T., Kawai T. (2014):** Toll-like receptor signaling pathways. *Frontiers in immunology* 5, S. 461.
- Keshavarz M., Faraj Tabrizi S., Ruppert A.-L., 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. (2022):** Cysteinyl leukotrienes and acetylcholine are biliary tuft cell cotransmitters. *Science immunology* 7 (69), eabf6734.
- Kim S.-H., Hadley S. H., Maddison M., Patil M., Cha B., Kollarik M., Taylor-Clark T. E. (2020):** Mapping of Sensory Nerve Subsets within the Vagal Ganglia and the Brainstem Using Reporter Mice for Pirt, TRPV1, 5-HT3, and Tac1 Expression. *eNeuro* 7 (2)
- Kinnamon S. C. (2012):** Taste receptor signalling - from tongues to lungs. *Acta physiologica* 204 (2), S. 158–168.
- Kinnamon S. C., Finger T. E. (2019):** Recent advances in taste transduction and signaling. *F1000Research* 8.
- Klein M. K., Haberberger R. V., Hartmann P., Faulhammer P., Lips K. S., Krain B., Wess J., Kummer W., König P. (2009):** Muscarinic receptor subtypes in cilia-driven transport and airway epithelial development. *The European respiratory journal* 33 (5), S. 1113–1121.
- Kojima I., Nakagawa Y., Ohtsu Y., Medina A., Nagasawa M. (2014):** Sweet Taste-Sensing Receptors Expressed in Pancreatic  $\beta$ -Cells: Sweet Molecules Act as Biased Agonists. *Endocrinology and Metabolism* 29 (1), S. 12–19.
- Kollarik M., Sun H., Herbstsomer R. A., Ru F., Kocmalova M., Meeker S. N., Udem B. J. (2018):** Different role of TTX-sensitive voltage-gated sodium channel (NaV 1) subtypes in action potential initiation and conduction in vagal airway nociceptors. *The Journal of physiology* 596 (8), S. 1419–1432.
- König P., Krain B., Krasteva G., Kummer W. (2009):** Serotonin increases cilia-driven particle transport via an acetylcholine-independent pathway in the mouse trachea. *PloS one* 4 (3), e4938.
- Krasteva G., Canning B. J., Hartmann P., Veres T. Z., Papadakis T., Mühlfeld C., Schliecker K., Tallini Y. N., Braun A., Hackstein H., Baal N., Weihe E., Schütz B., Kotlikoff M., Ibanez-Tallon I., Kummer W. (2011):** Cholinergic chemosensory cells in the trachea regulate breathing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (23), S. 9478–9483.

- Krasteva G., Canning B. J., Papadakis T., Kummer W. (2012a):** Cholinergic brush cells in the trachea mediate respiratory responses to quorum sensing molecules. *Life sciences* 91 (21-22), S. 992–996.
- Krasteva G., Hartmann P., Papadakis T., Bodenbenner M., Wessels L., Weihe E., Schütz B., Langheinrich A. C., Chubanov V., Gudermann T., Ibanez-Tallon I., Kummer W. (2012b):** Cholinergic chemosensory cells in the auditory tube. *Histochemistry and cell biology* 137 (4), S. 483–497.
- Kuek L. E., Lee R. J. (2020):** First contact: the role of respiratory cilia in host-pathogen interactions in the airways. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 319 (4), L603-L619.
- Kuhn C., Bufe B., Batram C., Meyerhof W. (2010):** Oligomerization of TAS2R bitter taste receptors. *Chemical senses* 35 (5), S. 395–406.
- Kumar H., Kawai T., Akira S. (2011):** Pathogen recognition by the innate immune system. *International reviews of immunology* 30 (1), S. 16–34.
- Kummer W., Fischer A., Kurkowski R., Heym C. (1992):** The sensory and sympathetic innervation of guinea-pig lung and trachea as studied by retrograde neuronal tracing and double-labelling immunohistochemistry. *Neuroscience* 49 (3), S. 715–737
- Kummer W., Krasteva-Christ G. (2014):** Non-neuronal cholinergic airway epithelium biology. *Current opinion in pharmacology* 16, S. 43–49.
- Kummer W., Lips K. S., Pfeil U. (2008):** The epithelial cholinergic system of the airways. *Histochemistry and cell biology* 130 (2), S. 219–234.
- Kurbatova P., Bessonov N., Volpert V., Tiddens H. A. W. M., Cornu C., Nony P., Caudri D. (2015):** Model of mucociliary clearance in cystic fibrosis lungs. *Journal of theoretical biology* 372, S. 81–88.
- Kusuhara Y., Yoshida R., Ohkuri T., Yasumatsu K., Voigt A., Hübner S., Maeda K., Boehm U., Meyerhof W., Ninomiya Y. (2013):** Taste responses in mice lacking taste receptor subunit T1R1. *The Journal of physiology* 591 (7), S. 1967–1985.
- Kusumakshi S., Voigt A., Hübner S., Hermans-Borgmeyer I., Ortalli A., Pyrski M., Dörr J., Zufall F., Flockerzi V., Meyerhof W., Montmayeur J.-P., Boehm U. (2015):** A Binary Genetic Approach to Characterize TRPM5 Cells in Mice. *Chemical senses* 40 (6), S. 413–425.
- Kyriazis G. A., Soundarapandian M. M., Tyrberg B. (2012):** Sweet taste receptor signaling in beta cells mediates fructose-induced potentiation of glucose-stimulated insulin secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (8), E524-32.

- Lacy M. (1995):** Expression of the receptors for the C5a anaphylatoxin, interleukin-8 and FMLP by human astrocytes and microglia. *Journal of Neuroimmunology* 61 (1), S. 71–78.
- Lansley A. B., Sanderson M. J. (1999):** Regulation of Airway Ciliary Activity by Ca<sup>2+</sup>: Simultaneous Measurement of Beat Frequency and Intracellular Ca<sup>2+</sup>. *Biophysical Journal* 77 (1), S. 629–638.
- Laugerette F., Passilly-Degrace P., Patris B., Niot I., Febbraio M., Montmayeur J.-P., Besnard P. (2005):** CD36 involvement in orosensory detection of dietary lipids, spontaneous fat preference, and digestive secretions. *Journal of Clinical Investigation* 115 (11), S. 3177–3184.
- Lazarinis N., Bood J., Gomez C., Kolmert J., Lantz A.-S., Gyllfors P., Davis A., Wheelock C. E., Dahlén S.-E., Dahlén B. (2018):** Leukotriene E4 induces airflow obstruction and mast cell activation through the cysteinyl leukotriene type 1 receptor. *The Journal of allergy and clinical immunology* 142 (4), S. 1080–1089.
- Lee J., Zhang L. (2015):** The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein & cell* 6 (1), S. 26–41.
- Lee R. J., Chen B., Redding K. M., Margolskee R. F., Cohen N. A. (2014):** Mouse nasal epithelial innate immune responses to *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecules require taste signaling components. *Innate immunity* 20 (6), S. 606–617.
- Lee R. J., Cohen N. A. (2014a):** Sinonasal solitary chemosensory cells “taste” the upper respiratory environment to regulate innate immunity. *American journal of rhinology & allergy* 28 (5), S. 366–373.
- Lee R. J., Cohen N. A. (2014b):** Taste Receptors in Innate Immunity. *Cellular and molecular life sciences* 72 (2), S. 217–236.
- Lee R. J., Hariri B. M., McMahon D. B., Chen B., Doghramji L., Adappa N. D., Palmer J. N., Kennedy D. W., Jiang P., Margolskee R. F., Cohen N. A. (2017):** Bacterial d-amino acids suppress sinonasal innate immunity through sweet taste receptors in solitary chemosensory cells. *Science signaling* 10 (495).
- Lee R. J., Workman A. D., Carey R. M., Chen B., Rosen P. L., Doghramji L., Adappa N. D., Palmer J. N., Kennedy D. W., Cohen N. A. (2016):** Fungal Aflatoxins Reduce Respiratory Mucosal Ciliary Function. *Scientific reports* 6, S. 33221.

- Lee R. J., Xiong G., Kofonow J. M., Chen B., Lysenko A., Jiang P., Abraham V., Doghramji L., Adappa N. D., Palmer J. N., Kennedy D. W., Beauchamp G. K., Doulias P.-T., Ischiropoulos H., Kreindler J. L., Reed D. R., Cohen N. A. (2012):** T2R38 taste receptor polymorphisms underlie susceptibility to upper respiratory infection. *The Journal of clinical investigation* 122 (11), S. 4145–4159.
- Leff J. A., Busse W. W., Pearlman D., Bronsky E. A., Kemp J., Hendeles L., Dockhorn R., Kundu S., Zhang J., Seidenberg B. C., Reiss T. F. (1998):** Montelukast, a leukotriene-receptor antagonist, for the treatment of mild asthma and exercise-induced bronchoconstriction. *The New England journal of medicine* 339 (3), S. 147–152.
- Lei W., Ren W., Ohmoto M., Urban J. F., Matsumoto I., Margolskee R. F., Jiang P. (2018):** Activation of intestinal tuft cell-expressed *Sucnr1* triggers type 2 immunity in the mouse small intestine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115 (21), S. 5552–5557.
- Lembo A., Kalis C., Kirschning C. J., Mitolo V., Jirillo E., Wagner H., Galanos C., Freudenberg M. A. (2003):** Differential contribution of Toll-like receptors 4 and 2 to the cytokine response to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Staphylococcus aureus* in mice. *Infection and immunity* 71 (10), S. 6058–6062.
- Li M., Wang Z.-N., Yang L.-F., Yan Y., Cai L.-M., Li Y.-T., Qiao Y.-K., Chen Z.-G. (2017):** TLR4 antagonist suppresses airway remodeling in asthma by inhibiting the T-helper 2 response. *Experimental and Therapeutic Medicine* 14 (4), S. 2911–2916.
- Li X., Staszewski L., Xu H., Durick K., Zoller M., Adler E. (2002):** Human receptors for sweet and umami taste. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (7), S. 4692–4696.
- Li X.-D., Chen Z. J. (2012):** Sequence specific detection of bacterial 23S ribosomal RNA by TLR13. *eLife* 1, e00102.
- Liberles S. D., Horowitz L. F., Kuang D., Contos J. J., Wilson K. L., Siltberg-Liberles J., Liberles D. A., Buck L. B. (2009):** Formyl peptide receptors are candidate chemosensory receptors in the vomeronasal organ. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (24), S. 9842–9847.
- Lietsche J., Imran I., Klein J. (2016):** Extracellular levels of ATP and acetylcholine during lithium-pilocarpine induced status epilepticus in rats. *Neuroscience letters* 611, S. 69–73.

- Lindberg S., Dolata J., Mercke U. (1986):** Effects of neurokinin A and calcitonin gene-related peptide on mucociliary activity in rabbit maxillary sinus. *Regulatory Peptides* 16 (1), S. 15–25.
- Litman P. M., Day A., Kelley T. J., Darrah R. J. (2021):** Serum inflammatory profiles in cystic fibrosis mice with and without *Bordetella pseudohinzii* infection. *Scientific reports* 11.
- Litvinov S. V., Velders M. P., Bakker H. A., Fleuren G. J., Warnaar S. O. (1994):** Ep-CAM: a human epithelial antigen is a homophilic cell-cell adhesion molecule. *The Journal of cell biology* 125 (2), S. 437–446.
- Liu P., Shah B. P., Croasdell S., Gilbertson T. A. (2011):** Transient Receptor Potential Channel Type M5 Is Essential for Fat Taste. *Journal of Neuroscience* 31 (23), S. 8634–8642.
- Liu S., Lu S., Xu R., Atzberger A., Günther S., Wettschureck N., Offermanns S. (2017):** Members of Bitter Taste Receptor Cluster Tas2r143/Tas2r135/Tas2r126 Are Expressed in the Epithelium of Murine Airways and Other Non-gustatory Tissues. *Frontiers in physiology* 8, S. 849.
- Liu Y., Chen K., Wang J. M. (2013):** FPR Ligands. *Handbook of Biologically Active Peptides*, S. 671–680.
- LopezJimenez N. D., Cavenagh M. M., Sainz E., Cruz-Ithier M. A., Battey J. F., Sullivan S. L. (2006):** Two members of the TRPP family of ion channels, Pkd1l3 and Pkd2l1, are co-expressed in a subset of taste receptor cells. *Journal of neurochemistry* 98 (1), S. 68–77.
- Lossow K., Hermans-Borgmeyer I., Meyerhof W., Behrens M. (2020):** Segregated Expression of ENaC Subunits in Taste Cells. *Chemical senses* 45 (4), S. 235–248.
- Lossow K., Hübner S., Roudnitzky N., Slack J. P., Pollastro F., Behrens M., Meyerhof W. (2016):** Comprehensive Analysis of Mouse Bitter Taste Receptors Reveals Different Molecular Receptive Ranges for Orthologous Receptors in Mice and Humans. *The Journal of biological chemistry* 291 (29), S. 15358–15377.
- Luciano L., Reale E. (1990):** Brush cells of the mouse gallbladder. A correlative light- and electron-microscopical study. *Cell and tissue research* 262 (2), S. 339–349.
- Luciano L., Reale E., Ruska H. (1969):** Bürstenzellen im Alveolarepithel der Rattenlunge. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie* 95 (2), S. 198–201.
- Madisen L., Garner A. R., Shimaoka D., Chuong A. S., Klapoetke N. C., Li L., van der Bourg A., Niino Y., Egolf L., Monetti C., Gu H., Mills M., Cheng A., Tasic B., Nguyen T. N., Sunkin S. M., Benucci A., Nagy A., Miyawaki A., Helmchen F., Empson R. M., Knöpfel T., Boyden E. S., Reid R. C., Carandini M., Zeng H. (2015):** Transgenic mice for intersectional targeting of neural sensors and effectors with high specificity and performance. *Neuron* 85 (5), S. 942–958.

**Mahmoud W., Perniss A., Poharkar K., Soultanova A., Pfeil U., Hoek A., Bhushan S., Hain T., Gärtner U., Kummer W. (2021):** CXCL13 is expressed in a subpopulation of neuroendocrine cells in the murine trachea and lung. *Cell and tissue research*. Nov 11. (ahead of print)

**Mall M. A., Button B., Johannesson B., Zhou Z., Livraghi A., Caldwell R. A., Schubert S. C., Schultz C., O'Neal W. K., Pradervand S., Hummler E., Rossier B. C., Grubb B. R., Boucher R. C. (2010):** Airway surface liquid volume regulation determines different airway phenotypes in liddle compared with betaENaC-overexpressing mice. *The Journal of biological chemistry* 285 (35), S. 26945–26955.

**Manning P. J., Watson R. M., Margolskee D. J., Williams V. C., Schwartz J. I., O'Byrne P. M. (1990):** Inhibition of exercise-induced bronchoconstriction by MK-571, a potent leukotriene D4-receptor antagonist. *The New England journal of medicine* 323 (25), S. 1736–1739.

**Mao D., Yasuda R. P., Fan H., Wolfe B. B., Kellar K. J. (2006):** Heterogeneity of nicotinic cholinergic receptors in rat superior cervical and nodose Ganglia. *Molecular pharmacology* 70 (5), S. 1693–1699.

**Maouche K., Polette M., Jolly T., Medjber K., Cloëz-Tayarani I., Changeux J.-P., Burlet H., Terryn C., Coraux C., Zahm J.-M., Birembaut P., Tournier J.-M. (2009):**  $\alpha 7$  Nicotinic Acetylcholine Receptor Regulates Airway Epithelium Differentiation by Controlling Basal Cell Proliferation. *The American journal of pathology* 175 (5), S. 1868–1882.

**Margolskee R. F. (2002):** Molecular mechanisms of bitter and sweet taste transduction. *The Journal of biological chemistry* 277 (1), S. 1–4.

**Matsui M., Motomura D., Fujikawa T., Jiang J., Takahashi S., Manabe T., Taketo M. M. (2002):** Mice Lacking M 2 and M 3 Muscarinic Acetylcholine Receptors Are Devoid of Cholinergic Smooth Muscle Contractions But Still Viable. *Journal of Neuroscience* 22 (24), S. 10627–10632.

**Matsumoto I., Ohmoto M., Narukawa M., Yoshihara Y., Abe K. (2011):** Skn-1a (Pou2f3) specifies taste receptor cell lineage. *Nature neuroscience* 14 (6), S. 685–687.

**Mayhew T. M., Myklebust R., Whybrow A., Jenkins R. (1999):** Epithelial integrity, cell death and cell loss in mammalian small intestine. *Histology and histopathology* 14 (1), S. 257–267.

**Mazzone S. B., McGovern A. E. (2008):** Immunohistochemical characterization of nodose cough receptor neurons projecting to the trachea of guinea pigs. *Cough* 4, S. 9.

**Mazzone S. B., McGovern A. E. (2010):** Innervation of tracheal parasympathetic ganglia by esophageal cholinergic neurons: evidence from anatomic and functional studies in guinea pigs. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 298 (3), L404-16.

- Mazzone S. B., Reynolds S. M., Mori N., Kollarik M., Farmer D. G., Myers A. C., Canning B. J. (2009):** Selective expression of a sodium pump isozyme by cough receptors and evidence for its essential role in regulating cough. *Journal of Neuroscience* 29 (43), S. 13662–13671.
- Mazzone S. B., Udem B. J. (2016):** Vagal Afferent Innervation of the Airways in Health and Disease. *Physiological reviews* 96 (3), S. 975–1024.
- McGinty J. W., Ting H.-A., Billipp T. E., Nadsombati M. S., Khan D. M., Barrett N. A., Liang H.-E., Matsumoto I., Moltke J. von (2020):** Tuft-Cell-Derived Leukotrienes Drive Rapid Anti-helminth Immunity in the Small Intestine but Are Dispensable for Anti-protist Immunity. *Immunity* 52 (3), 528-541.e7.
- McGovern A. E., Davis-Poynter N., Farrell M. J., Mazzone S. B. (2012):** Transneuronal tracing of airways-related sensory circuitry using herpes simplex virus 1, strain H129. *Neuroscience* 207, S. 148–166.
- McKay D. M., Shute A., Lopes F. (2017):** Helminths and intestinal barrier function. *Tissue barriers* 5 (1), e1283385.
- Meredith M., Marques D. M., O’Connell R. O., Stern F. L. (1980):** Vomeronasal pump: significance for male hamster sexual behavior. *Science* 207 (4436), S. 1224–1226.
- Meyerhof W. (2005):** Elucidation of mammalian bitter taste. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology* 154, S. 37–72.
- Middelhoff M., Nienhüser H., Valenti G., Maurer H. C., Hayakawa Y., Takahashi R., Kim W., Jiang Z., Malagola E., Cuti K., Tailor Y., Zamechek L. B., Renz B. W., Quante M., Yan K. S., Wang T. C. (2020):** Prox1-positive cells monitor and sustain the murine intestinal epithelial cholinergic niche. *Nature communications* 11 (1), S. 111.
- Middelhoff M., Westphalen C. B., Hayakawa Y., Yan K. S., Gershon M. D., Wang T. C., Quante M. (2017):** Dclk1-expressing tuft cells: critical modulators of the intestinal niche? *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 313 (4), G285-G299.
- Migeotte I., Communi D., Parmentier M. (2006):** Formyl peptide receptors: a promiscuous subfamily of G protein-coupled receptors controlling immune responses. *Cytokine & growth factor reviews* 17 (6), S. 501–519.
- Mijares L. A., Wangdi T., Sokol C., Homer R., Medzhitov R., Kazmierczak B. I. (2011):** Airway epithelial MyD88 restores control of *Pseudomonas aeruginosa* murine infection via an IL-1-dependent pathway. *Journal of immunology* 186 (12), S. 7080–7088.

**Miller C. N., Proekt I., Moltke J. von, Wells K. L., Rajpurkar A. R., Wang H., Rattay K., Khan I. S., Metzger T. C., Pollack J. L., Fries A. C., Lwin W. W., Wigton E. J., Parent A. V., Kyewski B., Erle D. J., Hogquist K. A., Steinmetz L. M., Locksley R. M., Anderson M. S. (2018):** Thymic tuft cells promote an IL-4-enriched medulla and shape thymocyte development. *Nature* 559 (7715), S. 627–631.

**Misgeld T., Burgess R. W., Lewis R. M., Cunningham J. M., Lichtman J. W., Sanes J. R. (2002):** Roles of Neurotransmitter in Synapse Formation. *Neuron* 36 (4), S. 635–648.

**Moine F., Brechbühl J., Nenniger Tosato M., Beaumann M., Broillet M.-C. (2018):** Alarm pheromone and kairomone detection via bitter taste receptors in the mouse Grueneberg ganglion. *BMC biology* 16.

**Moltke J. von, Ji M., Liang H.-E., Locksley R. M. (2016):** Tuft-cell-derived IL-25 regulates an intestinal ILC2-epithelial response circuit. *Nature* 529 (7585), S. 221–225.

**Moltke J. von, O’Leary C. E., Barrett N. A., Kanaoka Y., Austen K. F., Locksley R. M. (2017):** Leukotrienes provide an NFAT-dependent signal that synergizes with IL-33 to activate ILC2s. *The Journal of experimental medicine* 214 (1), S. 27–37.

**Montoro D. T., Haber A. L., Biton M., Vinarsky V., Lin B., Birket S. E., Yuan F., Chen S., Leung H. M., Villoria J., Rogel N., Burgin G., Tsankov A. M., Waghray A., Slyper M., Waldman J., Nguyen L., Dionne D., Rozenblatt-Rosen O., Tata P. R., Mou H., Shivaraju M., Bihler H., Mense M., Tearney G. J., Rowe S. M., Engelhardt J. F., Regev A., Rajagopal J. (2018):** A revised airway epithelial hierarchy includes CFTR-expressing ionocytes. *Nature* 560 (7718), S. 319–324.

**Moresco E. M. Y., LaVine D., Beutler B. (2011):** Toll-like receptors. *Current biology: CB* 21 (13), R488-93.

**Morris D. (1966):** The choline acetyltransferase of human placenta. *The Biochemical journal* 98 (3), S. 754–762.

**Mosinger B., Redding K. M., Parker M. R., Yevshayeva V., Yee K. K., Dyomina K., Li Y., Margolskee R. F. (2013):** Genetic loss or pharmacological blockade of testes-expressed taste genes causes male sterility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (30), S. 12319–12324.

**Müller M., Mentel M., van Hellemond J. J., Henze K., Woehle C., Gould S. B., Yu R.-Y., van der Giezen M., Tielens A. G. M., Martin W. F. (2012):** Biochemistry and Evolution of Anaerobic Energy Metabolism in Eukaryotes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR* 76 (2), S. 444–495.

- Murphy P. M., Ozçelik T., Kenney R. T., Tiffany H. L., McDermott D., Francke U. (1992):** A structural homologue of the N-formyl peptide receptor. Characterization and chromosome mapping of a peptide chemoattractant receptor family. *The Journal of biological chemistry* 267 (11), S. 7637–7643.
- Murray S. A., Morgan J. L., Kane C., Sharma Y., Heffner C. S., Lake J., Donahue L. R. (2010):** Mouse gestation length is genetically determined. *PloS one* 5 (8), e12418.
- Muto Y., Guindon S., Umemura T., Kōhidai L., Ueda H. (2015):** Adaptive evolution of formyl peptide receptors in mammals. *Journal of molecular evolution* 80 (2), S. 130–141.
- Myers A., Udem B., Kummer W. (1996):** Anatomical and electrophysiological comparison of the sensory innervation of bronchial and tracheal parasympathetic ganglion neurons. *Journal of the Autonomic Nervous System* 61 (2), S. 162–168.
- Nadsjombati M. S., McGinty J. W., Lyons-Cohen M. R., Jaffe J. B., DiPeso L., Schneider C., Miller C. N., Pollack J. L., Nagana Gowda G. A., Fontana M. F., Erle D. J., Anderson M. S., Locksley R. M., Raftery D., Moltke J. von (2018):** Detection of Succinate by Intestinal Tuft Cells Triggers a Type 2 Innate Immune Circuit. *Immunity* 49 (1), 33-41.e7.
- Nagao-Kitamoto H., Shreiner A. B., Gilliland M. G., Kitamoto S., Ishii C., Hirayama A., Kuffa P., El-Zaatari M., Grasberger H., Seekatz A. M., Higgins P. D., Young V. B., Fukuda S., Kao J. Y., Kamada N. (2016):** Functional Characterization of Inflammatory Bowel Disease–Associated Gut Dysbiosis in Gnotobiotic Mice. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* 2 (4), S. 468–481.
- Nagel G., Szellas T., Huhn W., Kateriya S., Adeishvili N., Berthold P., Ollig D., Hegemann P., Bamberg E. (2003):** Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (24), S. 13940–13945.
- Nakashima K., Eddy M. C., Katsukawa H., Delay E. R., Ninomiya Y. (2012):** Behavioral responses to glutamate receptor agonists and antagonists implicate the involvement of brain-expressed mGluR4 and mGluR1 in taste transduction for umami in mice. *Physiology & behavior* 105 (3), S. 709–719.
- Napolitano F., Rossi F. W., Pesapane A., Varricchio S., Ilardi G., Mascolo M., Staibano S., Lavecchia A., Ragno P., Selleri C., Marone G., Matucci-Cerinic M., Paulis A. de, Montuori N. (2018):** N-Formyl Peptide Receptors Induce Radical Oxygen Production in Fibroblasts Derived From Systemic Sclerosis by Interacting With a Cleaved Form of Urokinase Receptor. *Frontiers in immunology* 9, S. 574.

- Narukawa M., Minamisawa E., Hayashi Y. (2009):** Signalling mechanisms in mouse bitter responsive taste cells. *Neuroreport* 20 (10), S. 936–940
- Nassenstein C., Wiegand S., Lips K. S., Li G., Klein J., Kummer W. (2013):** Cholinergic control of the murine trachealis muscle via non-vesicular acetylcholine release involving NK1 receptor activation. *Autonomic Neuroscience* 177 (2), S. 310.
- Nawroth J. C., van der Does A. M., Ryan A., Kanso E. (2019):** Multiscale mechanics of mucociliary clearance in the lung. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 375 (1792).
- Nelson G., Chandrashekar J., Hoon M. A., Feng L., Zhao G., Ryba N. J. P., Zuker C. S. (2002):** An amino-acid taste receptor. *Nature* 416 (6877), S. 199–202.
- Nelson G., Hoon M. A., Chandrashekar J., Zhang Y., Ryba N. J., Zuker C. S. (2001):** Mammalian Sweet Taste Receptors. *Cell* 106 (3), S. 381–390.
- Nelson T. M., LopezJimenez N. D., Tessarollo L., Inoue M., Bachmanov A. A., Sullivan S. L. (2010):** Taste function in mice with a targeted mutation of the *pkd1l3* gene. *Chemical senses* 35 (7), S. 565–577.
- Nevo S., Kadouri N., Abramson J. (2019):** Tuft cells: From the mucosa to the thymus. *Immunology letters* 210, S. 1–9.
- Niedermayer T., Eckhardt B., Lenz P. (2008):** Synchronization, phase locking, and metachronal wave formation in ciliary chains. *Chaos* 18 (3), S. 37128.
- O’Grady S. M., Patil N., Melkamu T., Maniak P. J., Lancto C., Kita H. (2013):** ATP release and Ca<sup>2+</sup> signalling by human bronchial epithelial cells following *Alternaria* aeroallergen exposure. *The Journal of physiology* 591 (18), S. 4595–4609.
- Ogura T., Krosnowski K., Zhang L., Bekkerman M., Lin W. (2010):** Chemoreception regulates chemical access to mouse vomeronasal organ: role of solitary chemosensory cells. *PloS one* 5 (7), e11924.
- Øie C. I., Snapkov I., Elvevold K., Sveinbjørnsson B., Smedsrød B. (2016):** FITC Conjugation Markedly Enhances Hepatic Clearance of N-Formyl Peptides. *PloS one* 11 (8), e0160602.
- O’Leary C. E., Schneider C., Locksley R. M. (2019):** Tuft Cells-Systemically Dispersed Sensory Epithelia Integrating Immune and Neural Circuitry. *Annual review of immunology* 37, S. 47–72.

- Pack R. J., Al-Ugaily L. H., Morris G., Widdicombe J. G. (1980):** The distribution and structure of cells in the tracheal epithelium of the mouse. *Cell and tissue research* 208 (1), S. 65–84.
- Pan J., Zhang L., Shao X., Huang J. (2020):** Acetylcholine From Tuft Cells: The Updated Insights Beyond Its Immune and Chemosensory Functions. *Frontiers in cell and developmental biology* 8, S. 606.
- Panneck A. R., Rafiq A., Schütz B., Soultanova A., Deckmann K., Chubanov V., Gudermann T., Weihe E., Krasteva-Christ G., Grau V., Del Rey A., Kummer W. (2014):** Cholinergic epithelial cell with chemosensory traits in murine thymic medulla. *Cell and tissue research* 358 (3), S. 737–748.
- Park K.-S., Liang M.-C., Raiser D. M., Zamponi R., Roach R. R., Curtis S. J., Walton Z., Schaffer B. E., Roake C. M., Zmoos A.-F., Kriegel C., Wong K.-K., Sage J., Kim C. F. (2011):** Characterization of the cell of origin for small cell lung cancer. *Cell cycle* 10 (16), S. 2806–2815.
- Patel N. N., Workman A. D., Cohen N. A. (2018):** Role of Taste Receptors as Sentinels of Innate Immunity in the Upper Airway. *Journal of pathogens* 2018, S. 9541987.
- Perniss A., Latz A., Boseva I., Papadakis T., Dames C., Meisel C., Meisel A., Scholze P., Kummer W., Krasteva-Christ G. (2020a):** Acute nicotine administration stimulates ciliary activity via  $\alpha 3\beta 4$  nAChR in the mouse trachea. *International immunopharmacology* 84, S. 106496.
- Perniss A., Liu S., Boonen B., Keshavarz M., Ruppert A.-L., Timm T., Pfeil U., Soultanova A., Kusumakshi S., Delventhal L., Aydin Ö., Pyrski M., Deckmann K., Hain T., Schmidt N., Ewers C., Günther A., Lochnit G., Chubanov V., Gudermann T., Oberwinkler J., Klein J., Mikoshiba K., Leinders-Zufall T., Offermanns S., Schütz B., Boehm U., Zufall F., Bufe B., Kummer W. (2020b):** Chemosensory Cell-Derived Acetylcholine Drives Tracheal Mucociliary Clearance in Response to Virulence-Associated Formyl Peptides. *Immunity* 52 (4), 683-699.e11.
- Perniss A., Schmidt N., Gurtner C., Dietert K., Schwengers O., Weigel M., Hempe J., Ewers C., Pfeil U., Gärtner U., Gruber A. D., Hain T., Kummer W. (2018):** Bordetella pseudohinzii targets cilia and impairs tracheal cilia-driven transport in naturally acquired infection in mice. *Scientific reports* 8 (1), S. 5681.
- Perniss A., Schmidt P., Soultanova A., Papadakis T., Dahlke K., Voigt A., Schütz B., Kummer W., Deckmann K. (2021):** Development of epithelial cholinergic chemosensory cells of the urethra and trachea of mice. *Cell and tissue research* 385 (1), S. 21–35.

**Peto L., Nadjm B., Horby P., Ngan T. T. D., van Doorn R., van Kinh N., Wertheim H. F. L. (2014):** The bacterial aetiology of adult community-acquired pneumonia in Asia: a systematic review. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 108 (6), S. 326–337.

**Picciotto M. R., Higley M. J., Mineur Y. S. (2012):** Acetylcholine as a neuromodulator: cholinergic signaling shapes nervous system function and behavior. *Neuron* 76 (1), S. 116–129.

**Pieper M., Schulz-Hildebrandt H., Mall M. A., Hüttmann G., König P. (2020):** Intravital microscopic optical coherence tomography imaging to assess mucus-mobilizing interventions for muco-obstructive lung disease in mice. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 318 (3), L518-L524.

**Plasschaert L. W., Žilionis R., Choo-Wing R., Savova V., Knehr J., Roma G., Klein A. M., Jaffe A. B. (2018):** A single cell atlas of the tracheal epithelium reveals the CFTR-rich pulmonary ionocyte. *Nature* 560 (7718), S. 377–381.

**Portal C., Gouyer V., Magnien M., Plet S., Gottrand F., Desseyn J.-L. (2017):** In vivo imaging of the Muc5b gel-forming mucin. *Scientific reports* 7, S. 44591.

**Prevete N., Liotti F., Marone G., Melillo R. M., Paulis A. de (2015):** Formyl peptide receptors at the interface of inflammation, angiogenesis and tumor growth. *Pharmacological research* 102, S. 184–191.

**Pritchett-Corning K. R., Prins J.-B., Feinstein R., Goodwin J., Nicklas W., Riley L. (20):** AALAS/FELASA Working Group on Health Monitoring of Rodents for Animal Transfer. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* 53 (6), S. 633–640.

**Randell S. H., Boucher R. C. (2006):** Effective mucus clearance is essential for respiratory health. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 35 (1), S. 20–28.

**Rane C. K., Jackson S. R., Pastore C. F., Zhao G., Weiner A. I., Patel N. N., Herbert D. R., Cohen N. A., Vaughan A. E. (2019):** Development of solitary chemosensory cells in the distal lung after severe influenza injury. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 316 (6), L1141-L1149.

**Raufman J.-P., Samimi R., Shah N., Khurana S., Shant J., Drachenberg C., Xie G., Wess J., Cheng K. (2008):** Genetic Ablation of M3 Muscarinic Receptors Attenuates Murine Colon Epithelial Cell Proliferation and Neoplasia. *Cancer research* 68 (10), S. 3573–3578.

- Reardon C., Duncan G. S., Brüstle A., Brenner D., Tusche M. W., Olofsson P. S., Olofsson P., Rosas-Ballina M., Tracey K. J., Mak T. W. (2013):** Lymphocyte-derived ACh regulates local innate but not adaptive immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (4), S. 1410–1415
- Rees D. D., Palmer R. M., Schulz R., Hodson H. F., Moncada S. (1990):** Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *British journal of pharmacology* 101 (3), S. 746–752.
- Regoli D., Boudon A., Fauchère J. L. (1994):** Receptors and antagonists for substance P and related peptides. *Pharmacological reviews* 46 (4), S. 551–599.
- Rhodin J. (1959):** LXVII Ultrastructure of the Tracheal Ciliated Mucosa in Rat and Man. *The Annals of otology, rhinology, and laryngology* 68 (4), S. 964–974.
- Rhodin J., Dalhamn T. (1956):** Electron microscopy of the tracheal ciliated mucosa in rat. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie* 44 (4), S. 345–412.
- Riera C. E., Vogel H., Simon S. A., Damak S., Le Coutre J. (2009):** Sensory attributes of complex tasting divalent salts are mediated by TRPM5 and TRPV1 channels. *Journal of Neuroscience*. 29 (8), S. 2654–2662.
- Rinner I., Schauenstein K. (1993):** Detection of choline-acetyltransferase activity in lymphocytes. *Journal of neuroscience research* 35 (2), S. 188–191.
- Riquelme S. A., Lozano C., Moustafa A. M., Liimatta K., Tomlinson K. L., Britto C., Khanal S., Gill S. K., Narechania A., Azcona-Gutiérrez J. M., DiMango E., Saézn Y., Planet P., Prince A. (2019):** CFTR-PTEN-dependent mitochondrial metabolic dysfunction promotes *Pseudomonas aeruginosa* airway infection. *Science translational medicine* 11 (499).
- Rivière S., Challet L., Fluegge D., Spehr M., Rodriguez I. (2009):** Formyl peptide receptor-like proteins are a novel family of vomeronasal chemosensors. *Nature* 459 (7246),
- Roh J. S., Sohn D. H. (2018):** Damage-Associated Molecular Patterns in Inflammatory Diseases. *Immune network* 18 (4), e27.
- Roper S. D. (2009):** Parallel processing in mammalian taste buds? *Physiology & behavior* 97 (5), S. 604–608.

**Roy M. G., Livraghi-Butrico A., Fletcher A. A., McElwee M. M., Evans S. E., Boerner R. M., Alexander S. N., Bellinghausen L. K., Song A. S., Petrova Y. M., Tuvim M. J., Adachi R., Romo I., Bordt A. S., Bowden M. G., Sisson J. H., Woodruff P. G., Thornton D. J., Rousseau K., La Garza M. M. de, Moghaddam S. J., Karmouty-Quintana H., Blackburn M. R., Drouin S. M., Davis C. W., Terrell K. A., Grubb B. R., O'Neal W. K., Flores S. C., Cota-Gomez A., Lozupone C. A., Donnelly J. M., Watson A. M., Hennessy C. E., Keith R. C., Yang I. V., Barthel L., Henson P. M., Janssen W. J., Schwartz D. A., Boucher R. C., Dickey B. F., Evans C. M. (2014):** Muc5b is required for airway defence. *Nature* 505 (7483), S. 412–416.

**Rubic T., Lametschwandtner G., Jost S., Hinteregger S., Kund J., Carballido-Perrig N., Schwärzler C., Junt T., Voshol H., Meingassner J. G., Mao X., Werner G., Rot A., Carballido J. M. (2008):** Triggering the succinate receptor GPR91 on dendritic cells enhances immunity. *Nature immunology* 9 (11), S. 1261–1269.

**Rubin B. K. (2002):** Physiology of airway mucus clearance. *Respiratory care* 47 (7), S. 761–768.

**Ruppert A.-L., Keshavarz M., Winterberg S., Oberwinkler J., Kummer W., Schütz B. (2020):** Advillin is a tuft cell marker in the mouse alimentary tract. *Journal of Molecular Histology* 51 (4), S. 421–435.

**Sainz E., Cavenagh M. M., Gutierrez J., Battey J. F., Northup J. K., Sullivan S. L. (2007):** Functional characterization of human bitter taste receptors. *The Biochemical journal* 403 (3), S. 537–543.

**Sakakura C., Hagiwara A., Nakanishi M., Shimomura K., Takagi T., Yasuoka R., Fujita Y., Abe T., Ichikawa Y., Takahashi S., Ishikawa T., Nishizuka I., Morita T., Shimada H., Okazaki Y., Hayashizaki Y., Yamagishi H. (2002):** Differential gene expression profiles of gastric cancer cells established from primary tumour and malignant ascites. *British journal of cancer* 87 (10), S. 1153–1161.

**Salathe M., Lipson E. J., Ivonnet P. I., Bookman R. J. (1997):** Muscarinic signaling in ciliated tracheal epithelial cells: dual effects on Ca<sup>2+</sup> and ciliary beating. *The American journal of physiology* 272 (2 Pt 1), L301-10.

**Saqui-Salces M., Keeley T. M., Grosse A. S., Qiao X. T., El-Zaatari M., Gumucio D. L., Samuelson L. C., Merchant J. L. (2011):** Gastric tuft cells express DCLK1 and are expanded in hyperplasia. *Histochemistry and cell biology* 136 (2), S. 191–204.

**Satir P., Christensen S. T. (2008):** Structure and function of mammalian cilia. *Histochemistry and cell biology* 129 (6), S. 687–693.

- Satir P., Pedersen L. B., Christensen S. T. (2010):** The primary cilium at a glance. *Journal of Cell Science* 123 (4), S. 499–503.
- Saunders C. J., Christensen M., Finger T. E., Tizzano M. (2014):** Cholinergic neurotransmission links solitary chemosensory cells to nasal inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (16), S. 6075–6080.
- Saunders C. J., Reynolds S. D., Finger T. E. (2013):** Chemosensory brush cells of the trachea. A stable population in a dynamic epithelium. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 49 (2), S. 190–196.
- Sbarbati A., Osculati F. (2005):** The taste cell-related diffuse chemosensory system. *Progress in neurobiology* 75 (4), S. 295–307.
- Schauer A. E., Klassert T. E., Lachner C. von, Riebold D., Schneeweiß A., Stock M., Müller M. M., Hammerschmidt S., Bufler P., Seifert U., Dietert K., Dinarello C. A., Nold M. F., Gruber A. D., Nold-Petry C. A., Slevogt H. (2017):** IL-37 Causes Excessive Inflammation and Tissue Damage in Murine Pneumococcal Pneumonia. *Journal of Innate Immunity* 9 (4), S. 403–418.
- Schiffmann E., Corcoran B. A., Wahl S. M. (1975):** N-formylmethionyl peptides as chemoattractants for leucocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72 (3), S. 1059–1062.
- Schirm S., Ahnert P., Berger S., Nouailles G., Wienhold S.-M., Müller-Redetzky H., Suttorp N., Loeffler M., Witzernath M., Scholz M. (2020):** A biomathematical model of immune response and barrier function in mice with pneumococcal lung infection. *PLoS one* 15 (12), e0243147.
- Schmid A., Salathe M. (2011):** Ciliary beat co-ordination by calcium. *Biology of the cell* 103 (4), S. 159–169.
- Schneider C., O’Leary C. E., Moltke J. von, Liang H.-E., Ang Q. Y., Turnbaugh P. J., Radhakrishnan S., Pellizzon M., Ma A., Locksley R. M. (2018):** A Metabolite-Triggered Tuft Cell-ILC2 Circuit Drives Small Intestinal Remodeling. *Cell* 174 (2), 271-284.e14.
- Schuil P. J., Berge M. ten, van Gelder J. M., Graamans K., Huizing E. H. (1995a):** Substance P and ciliary beat of human upper respiratory cilia in vitro. *The Annals of otology, rhinology, and laryngology* 104 (10 Pt 1), S. 798–802.
- Schuil P. J., Rosmalen J. G., Graamans K., Huizing E. H. (1995b):** Calcitonin gene-related peptide in vitro stimulation of ciliary beat in human upper respiratory cilia. *European archives of oto-rhino-laryngology* 252 (8), S. 462–464.

- Schütz B., Jurastow I., Bader S., Ringer C., Engelhardt J. von, Chubanov V., Gudermann T., Diener M., Kummer W., Krasteva-Christ G., Weihe E. (2015):** Chemical coding and chemosensory properties of cholinergic brush cells in the mouse gastrointestinal and biliary tract. *Frontiers in physiology* 6, S. 87.
- Schütz B., Ruppert A.-L., Strobel O., Lazarus M., Urade Y., Büchler M. W., Weihe E. (2019):** Distribution pattern and molecular signature of cholinergic tuft cells in human gastrointestinal and pancreatic-biliary tract. *Scientific reports* 9 (1), S. 17466.
- Sclafani A. (2004):** The sixth taste? *Appetite* 43 (1), S. 1–3.
- Sclafani A., Ackroff K., Abumrad N. A. (2007a):** CD36 gene deletion reduces fat preference and intake but not post-oral fat conditioning in mice. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 293 (5), R1823-32.
- Sclafani A., Zukerman S., Ackroff K. (2013):** GPR40 and GPR120 fatty acid sensors are critical for postoral but not oral mediation of fat preferences in the mouse. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 305 (12), R1490-7.
- Sclafani A., Zukerman S., Glendinning J. I., Margolskee R. F. (2007b):** Fat and carbohydrate preferences in mice: the contribution of alpha-gustducin and Trpm5 taste-signaling proteins. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 293 (4), R1504-13.
- Shah A. S., Ben-Shahar Y., Moninger T. O., Kline J. N., Welsh M. J. (2009):** Motile cilia of human airway epithelia are chemosensory. *Science* 325 (5944), S. 1131–1134.
- Shao G., Julian M. W., Bao S., McCullers M. K., Lai J.-P., Knoell D. L., Crouser E. D. (2010):** Formyl Peptide Receptor Ligands Promote Wound Closure in Lung Epithelial Cells. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 44 (3), S. 264–269.
- Shibao K., Fiedler M. J., Nagata J., Minagawa N., Hirata K., Nakayama Y., Iwakiri Y., Nathanson M. H., Yamaguchi K. (2010):** The type III inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is associated with aggressiveness of colorectal carcinoma. *Cell calcium* 48 (6), S. 315–323.
- Sidletskaya K., Vitkina T., Denisenko Y. (2020):** The Role of Toll-Like Receptors 2 and 4 in the Pathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *International journal of chronic obstructive pulmonary disease* 15, S. 1481–1493.
- Smith C. M., Kulkarni H., Radhakrishnan P., Rutman A., Bankart M. J., Williams G., Hirst R. A., Easton A. J., Andrew P. W., O'Callaghan C. (2014):** Ciliary dyskinesia is an early feature of respiratory syncytial virus infection. *The European respiratory journal* 43 (2), S. 485–496.

- Stempel H., Jung M., Pérez-Gómez A., Leinders-Zufall T., Zufall F., Bufe B. (2016):** Strain-specific Loss of Formyl Peptide Receptor 3 in the Murine Vomeronasal and Immune Systems. *The Journal of biological chemistry* 291 (18), S. 9762–9775.
- Stengel P. W., Yamada M., Wess J., Cohen M. L. (2002):** M3-receptor knockout mice: muscarinic receptor function in atria, stomach fundus, urinary bladder, and trachea. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 282 (5), R1443-9.
- Sui P., Wiesner D. L., Xu J., Zhang Y., Lee J., van Dyken S., Lashua A., Yu C., Klein B. S., Locksley R. M., Deutsch G., Sun X. (2018):** Pulmonary neuroendocrine cells amplify allergic asthma responses. *Science* 360 (6393).
- Sukumaran S. K., Yee K. K., Iwata S., Kotha R., Quezada-Calvillo R., Nichols B. L., Mohan S., Pinto B. M., Shigemura N., Ninomiya Y., Margolskee R. F. (2016):** Taste cell-expressed  $\alpha$ -glucosidase enzymes contribute to gustatory responses to disaccharides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (21), S. 6035–6040.
- Takahashi T., Ohnishi H., Sugiura Y., Honda K., Suematsu M., Kawasaki T., Deguchi T., Fujii T., Orihashi K., Hippo Y., Watanabe T., Yamagaki T., Yuba S. (2014):** Non-neuronal acetylcholine as an endogenous regulator of proliferation and differentiation of Lgr5-positive stem cells in mice. *The FEBS journal* 281 (20), S. 4672–4690.
- Takeuchi O., Akira S. (2010):** Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140 (6), S. 805–820.
- Tallini Y. N., Shui B., Greene K. S., Deng K.-Y., Doran R., Fisher P. J., Zipfel W., Kotlikoff M. I. (2006):** BAC transgenic mice express enhanced green fluorescent protein in central and peripheral cholinergic neurons. *Physiological genomics* 27 (3), S. 391–397.
- Tamaoki J., Kanemura T., Kobayashi K., Sakai N., Takizawa T. (1989):** Effects of calcitonin gene-related peptide on airway epithelial functions in dogs. *Peptides* 10 (5), S. 1007–1011.
- Tarran R., Button B., Boucher R. C. (2006):** Regulation of normal and cystic fibrosis airway surface liquid volume by phasic shear stress. *Annual review of physiology* 68, S. 543–561.
- Taruno A., Vingtdeux V., Ohmoto M., Ma Z., Dvoryanchikov G., Li A., Adrien L., Zhao H., Leung S., Abernethy M., Koppel J., Davies P., Civan M. M., Chaudhari N., Matsumoto I., Hellekant G., Tordoff M. G., Marambaud P., Foskett J. K. (2013):** CALHM1 ion channel mediates purinergic neurotransmission of sweet, bitter and umami tastes. *Nature* 495 (7440), S. 223–226.
- Teng B., Wilson C. E., Tu Y.-H., Joshi N. R., Kinnamon S. C., Liman E. R. (2019):** Cellular and Neural Responses to Sour Stimuli Require the Proton Channel Otop1. *Current biology: CB* 29 (21), 3647-3656.e5.

**Thompson R. J., Doran J. F., Jackson P., Dhillon A. P., Rode J. (1983):** PGP 9.5—a new marker for vertebrate neurons and neuroendocrine cells. *Brain Research* 278 (1-2), S. 224–228.

**Tiffany H. L., Lavigne M. C., Cui Y. H., Wang J. M., Leto T. L., Gao J. L., Murphy P. M. (2001):** Amyloid-beta induces chemotaxis and oxidant stress by acting at formylpeptide receptor 2, a G protein-coupled receptor expressed in phagocytes and brain. *The Journal of biological chemistry* 276 (26), S. 23645–23652.

**Ting H.-A., Moltke J. von (2019):** The Immune Function of Tuft Cells at Gut Mucosal Surfaces and Beyond<sup>1</sup>. *Journal of immunology* 202 (5), S. 1321–1329.

**Tizzano M., Cristofolletti M., Sbarbati A., Finger T. E. (2011):** Expression of taste receptors in solitary chemosensory cells of rodent airways. *BMC pulmonary medicine* 11, S. 3.

**Tizzano M., Gulbransen B. D., Vandenbeuch A., Clapp T. R., Herman J. P., Sibhatu H. M., Churchill M. E. A., Silver W. L., Kinnamon S. C., Finger T. E. (2010):** Nasal chemosensory cells use bitter taste signaling to detect irritants and bacterial signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (7), S. 3210–3215.

**Toews G. B. (1993):** Pulmonary defense mechanisms. *Seminars in respiratory infections* 8 (3), S. 160–167.

**Torres A., Blasi F., Peetermans W. E., Viegi G., Welte T. (2014):** The aetiology and antibiotic management of community-acquired pneumonia in adults in Europe: a literature review. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology* 33 (7), S. 1065–1079.

**Toyono T., Seta Y., Kataoka S., Kawano S., Shigemoto R., Toyoshima K. (2003):** Expression of metabotropic glutamate receptor group I in rat gustatory papillae. *Cell and tissue research* 313 (1), S. 29–35.

**Trauelsen M., Hiron T. K., Lin D., Petersen J. E., Breton B., Husted A. S., Hjorth S. A., Inoue A., Frimurer T. M., Bouvier M., O’Callaghan C. A., Schwartz T. W. (2021):** Extracellular succinate hyperpolarizes M2 macrophages through SUCNR1/GPR91-mediated Gq signaling. *Cell reports* 35 (11), S. 109246.

**Trier J. S., Allan C. H., Marcial M. A., Madara J. L. (1987):** Structural features of the apical and tubulovesicular membranes of rodent small intestinal tuft cells. *The Anatomical record* 219 (1), S. 69–77.

**Tu Y.-H., Cooper A. J., Teng B., Chang R. B., Artiga D. J., Turner H. N., Mulhall E. M., Ye W., Smith A. D., Liman E. R. (2018):** An evolutionarily conserved gene family encodes proton-selective ion channels. *Science* 359 (6379), S. 1047–1050.

- Tuomanen E. I., Nedelman J., Hendley J. O., Hewlett E. L. (1983):** Species specificity of Bordetella adherence to human and animal ciliated respiratory epithelial cells. *Infection and immunity* 42 (2), S. 692–695.
- Ualiyeva S., Hallen N., Kanaoka Y., Ledderose C., Matsumoto I., Junger W. G., Barrett N. A., Bankova L. G. (2020):** Airway brush cells generate cysteinyl leukotrienes through the ATP sensor P2Y2. *Science immunology* 5 (43).
- Valque H., Gouyer V., Duez C., Leboeuf C., Marquillies P., Le Bert M., Plet S., Ryffel B., Janin A., Gottrand F., Desseyn J.-L. (2019):** Muc5b-deficient mice develop early histological lung abnormalities. *Biology open* 8 (11).
- Valque H., Gouyer V., Husson M.-O., Gottrand F., Desseyn J.-L. (2011):** Abnormal expression of Muc5b in Cfr-null mice and in mammary tumors of MMTV-ras mice. *Histochemistry and cell biology* 136 (6), S. 699–708.
- van Delden C., Iglewski B. H. (1998):** Cell-to-cell signaling and Pseudomonas aeruginosa infections. *Emerging infectious diseases* 4 (4), S. 551–560.
- van Heeckeren A. M., Schluchter M. D. (2002):** Murine models of chronic Pseudomonas aeruginosa lung infection. *Laboratory animals* 36 (3), S. 291–312.
- VanCompernelle S. E., Clark K. L., Rummel K. A., Todd S. C. (2003):** Expression and function of formyl peptide receptors on human fibroblast cells. *Journal of immunology* 171 (4), S. 2050–2056.
- Vandenbeuch A., Kinnamon S. C. (2016):** Glutamate: Tastant and Neuromodulator in Taste Buds. *Advances in Nutrition* 7 (4), 823S–7S.
- Vandenbeuch A., Kinnamon S. C. (2020a):** Is the Amiloride-Sensitive Na<sup>+</sup> Channel in Taste Cells Really ENaC? *Chemical senses* 45 (4), S. 233–234.
- Vandenbeuch A., Kinnamon S. C. (2020b):** Why low concentrations of salt enhance sweet taste. *Acta physiologica* 230 (4), e13560.
- Voigt A., Hübner S., Döring L., Perlach N., Hermans-Borgmeyer I., Boehm U., Meyerhof W. (2015):** Cre-Mediated Recombination in Tas2r131 Cells-A Unique Way to Explore Bitter Taste Receptor Function Inside and Outside of the Taste System. *Chemical senses* 40 (9), S. 627–639.
- Wallmeier J., Nielsen K. G., Kuehni C. E., Lucas J. S., Leigh M. W., Zariwala M. A., Omran H. (2020):** Motile ciliopathies. *Nature reviews. Disease primers* 6 (1), S. 77.
- Wang J. Q., Jeelall Y. S., Ferguson L. L., Horikawa K. (2014):** Toll-Like Receptors and Cancer: MYD88 Mutation and Inflammation. *Frontiers in immunology* 5, S. 367.

- Wang Z.-G., Ye R. D. (2002):** Characterization of two new members of the formyl peptide receptor gene family from 129S6 mice. *Gene* 299 (1-2), S. 57–63.
- Wanner A., Salathé M., O’Riordan T. G. (1996):** Mucociliary clearance in the airways. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 154 (6), S. 1868–1902.
- Wei J.-W., Huang K., Yang C., Kang C.-S. (2017):** Non-coding RNAs as regulators in epigenetics. *Oncology reports* 37 (1), S. 3–9.
- Welsch U., Kummer W., Deller T. (2018):** Histologie. Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie: das Lehrbuch. Unter Mitarbeit von Stefan Elsberger. Urban-&-Fischer-Verlag. 5. Auflage, Elsevier.
- Werts C., Tapping R. I., Mathison J. C., Chuang T. H., Kravchenko V., Saint Girons I., Haake D. A., Godowski P. J., Hayashi F., Ozinsky A., Underhill D. M., Kirschning C. J., Wagner H., Aderem A., Tobias P. S., Ulevitch R. J. (2001):** Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nature immunology* 2 (4), S. 346–352.
- Wiederhold S., Papadakis T., Chubanov V., Gudermann T., Krasteva-Christ G., Kummer W. (2015):** A novel cholinergic epithelial cell with chemosensory traits in the murine conjunctiva. *International immunopharmacology* 29 (1), S. 45–50.
- Wijers C. D., Chmiel J. F., Gaston B. M. (2017):** Bacterial infections in patients with primary ciliary dyskinesia: Comparison with cystic fibrosis. *Chronic respiratory disease* 14 (4), S. 392–406.
- Witzenrath M., Pache F., Lorenz D., Koppe U., Gutbier B., Tabeling C., Reppe K., Meixenberger K., Dorhoi A., Ma J., Holmes A., Trendelenburg G., Heimesaat M. M., Bereswill S., van der Linden M., Tschopp J., Mitchell T. J., Suttorp N., Opitz B. (2011):** The NLRP3 inflammasome is differentially activated by pneumolysin variants and contributes to host defense in pneumococcal pneumonia. *Journal of immunology* 187 (1), S. 434–440.
- Wolf G., Saria A., Koidl B. (1988):** Pharmakologische Untersuchungen an kultivierten humanen Flimmerzellen des oberen Respirationstraktes. *Laryngo-Rhino-Otologie* 67 (10), S. 518–522.
- Wong L. B., Miller I. F., Yeates D. B. (1991):** Pathways of substance P stimulation of canine tracheal ciliary beat frequency. *Journal of applied physiology* 70 (1), S. 267–273.
- Wu H.-M., Zhao C.-C., Xie Q.-M., Xu J., Fei G.-H. (2020):** TLR2-Melatonin Feedback Loop Regulates the Activation of NLRP3 Inflammasome in Murine Allergic Airway Inflammation. *Frontiers in immunology* 11, S. 172.
- Xiao L., Wu Z.-X. (2012):** Substance p regulates environmental tobacco smoke-enhanced tracheal smooth muscle responsiveness in mice. *Journal of allergy* 2012, S. 423612.

- Xu J., Cao J., Iguchi N., Riethmacher D., Huang L. (2012):** Functional characterization of bitter-taste receptors expressed in mammalian testis. *Molecular Human Reproduction* 19 (1), S. 17–28.
- Yamada M., Miyakawa T., Duttaroy A., Yamanaka A., Moriguchi T., Makita R., Ogawa M., Chou C. J., Xia B., Crawley J. N., Felder C. C., Deng C. X., Wess J. (2001):** Mice lacking the M3 muscarinic acetylcholine receptor are hypophagic and lean. *Nature* 410 (6825), S. 207–212.
- Yamamoto M., Yamaguchi R., Munakata K., Takashima K., Nishiyama M., Hioki K., Ohnishi Y., Nagasaki M., Imoto S., Miyano S., Ishige A., Watanabe K. (2012):** A microarray analysis of gnotobiotic mice indicating that microbial exposure during the neonatal period plays an essential role in immune system development. *BMC genomics* 13, S. 335.
- Yamashita J., Ohmoto M., Yamaguchi T., Matsumoto I., Hirota J. (2017):** Skn-1a/Pou2f3 functions as a master regulator to generate Trpm5-expressing chemosensory cells in mice. *PLoS one* 12 (12), e0189340.
- Yan C. H., Hahn S., McMahon D., Bonislowski D., Kennedy D. W., Adappa N. D., Palmer J. N., Jiang P., Lee R. J., Cohen N. A. (2017):** Nitric oxide production is stimulated by bitter taste receptors ubiquitously expressed in the sinonasal cavity. *American journal of rhinology & allergy* 31 (2), S. 85–92.
- Yan W., Sunavala G., Rosenzweig S., Dasso M., Brand J. G., Spielman A. I. (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.
- Yang D., Chen Q., Gertz B., He R., Phulsuksombati M., Ye R. D., Oppenheim J. J. (2002):** Human dendritic cells express functional formyl peptide receptor-like-2 (FPRL2) throughout maturation. *Journal of leukocyte biology* 72 (3), S. 598–607.
- Yang D., Chen Q., Le Y., Wang J. M., Oppenheim J. J. (2001):** Differential regulation of formyl peptide receptor-like 1 expression during the differentiation of monocytes to dendritic cells and macrophages. *Journal of immunology* 166 (6), S. 4092–4098.
- Yasumatsu K., Manabe T., Yoshida R., Iwatsuki K., Uneyama H., Takahashi I., Ninomiya Y. (2015):** Involvement of multiple taste receptors in umami taste: analysis of gustatory nerve responses in metabotropic glutamate receptor 4 knockout mice. *The Journal of physiology* 593 (Pt 4), S. 1021–1034.
- Yasumatsu K., Ohkuri T., Yoshida R., Iwata S., Margolskee R. F., Ninomiya Y. (2020):** Sodium-glucose cotransporter 1 as a sugar taste sensor in mouse tongue. *Acta physiologica* 230 (4), e13529.

- Ye R. D., Boulay F., Wang J. M., Dahlgren C., Gerard C., Parmentier M., Serhan C. N., Murphy P. M. (2009):** International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIII. Nomenclature for the formyl peptide receptor (FPR) family. *Pharmacological reviews* 61 (2), S. 119–161.
- Yee K. K., Sukumaran S. K., Kotha R., Gilbertson T. A., Margolskee R. F. (2011):** Glucose transporters and ATP-gated K<sup>+</sup> (KATP) metabolic sensors are present in type 1 taste receptor 3 (T1r3)-expressing taste cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (13), S. 5431–5436.
- Yi W. J., Park K. S., Lee C. H., Rhee C. S. (2003):** Correlation between ciliary beat frequency and metachronal wave disorder using image analysis method. *Medical & biological engineering & computing* 41 (4), S. 481–485.
- Zagoory O., Braiman A., Gheber L., Priel Z. (2001):** Role of calcium and calmodulin in ciliary stimulation induced by acetylcholine. *American journal of physiology. Cell physiology* 280 (1), C100-9.
- Zanin M., Baviskar P., Webster R., Webby R. (2016):** The Interaction between Respiratory Pathogens and Mucus. *Cell host & microbe* 19 (2), S. 159–168.
- Zhai K., Yang Z., Zhu X., Nyirimigabo E., Mi Y., Wang Y., Liu Q., Man L., Wu S., Jin J., Ji G. (2016):** Activation of bitter taste receptors (tas2rs) relaxes detrusor smooth muscle and suppresses overactive bladder symptoms. *Oncotarget* 7 (16), S. 21156–21167.
- Zhang J., Jin H., Zhang W., Ding C., O’Keeffe S., Ye M., Zuker C. S. (2019):** Sour Sensing from the Tongue to the Brain. *Cell* 179 (2), 392-402.e15.
- Zhang M., Gao J.-L., Chen K., Yoshimura T., Liang W., Gong W., Li X., Huang J., McDermott D. H., Murphy P. M., Wang X., Wang J. M. (2020):** A Critical Role of Formyl Peptide Receptors in Host Defense against *Escherichia coli*. *Journal of immunology* 204 (9), S. 2464–2473.
- Zhang X.-H., Tee L. Y., Wang X.-G., Huang Q.-S., Yang S.-H. (2015):** Off-target Effects in CRISPR/Cas9-mediated Genome Engineering. *Molecular therapy. Nucleic acids* 4, e264.
- Zhao G. Q., Zhang Y., Hoon M. A., Chandrashekar J., Erlenbach I., Ryba N. J. P., Zuker C. S. (2003):** The receptors for mammalian sweet and umami taste. *Cell* 115 (3), S. 255–266.
- Zhao S., Ting J. T., Atallah H. E., Qiu L., Tan J., Gloss B., Augustine G. J., Deisseroth K., Luo M., Graybiel A. M., Feng G. (2011):** Cell type-specific channelrhodopsin-2 transgenic mice for optogenetic dissection of neural circuitry function. *Nature methods* 8 (9), S. 745–752.

**Zheng X., Tizzano M., Redding K., He J., Peng X., Jiang P., Xu X., Zhou X., Margolske R. F. (2019):** Gingival solitary chemosensory cells are immune sentinels for periodontitis. *Nature communications* 10.

**Zurborg S., Piszczek A., Martínez C., Hublitz P., Al Banhaabouchi M., Moreira P., Perlas E., Heppenstall P. A. (2011):** Generation and characterization of an Advillin-Cre driver mouse line. *Molecular pain* 7, S. 66.

## 11. Appendix

Appendix Tabelle 1: Anzahl von SCCC und PNEC im Trachealepithel der Maus. ....	276
Appendix Tabelle 2: Kolokalisation von ChAT-eGFP und ChAT-Antikörpermarkierung in <i>ChAT</i> -eGFP Reporter-mäusen. ....	276
Appendix Tabelle 3: Kolokalisation von ChAT-eGFP und TRPM5-Antikörpermarkierung in <i>ChAT</i> -eGFP Reporter-mäusen. ....	277
Appendix Tabelle 4: Kolokalisation von ChAT-eGFP und DCLK1-Antikörpermarkierung in <i>ChAT</i> -eGFP Reporter-mäusen. ....	277
Appendix Tabelle 5: Kolokalisation von <i>Tas2r143</i> -mCherry und TRPM5-Antikörpermarkierung in <i>Tas2R143</i> -mCherry Reporter-mäusen. ....	278
Appendix Tabelle 6: Kolokalisation von nativem YFP, antikörperverstärktem YFP (GFP) und TRPM5 in <i>ChAT-ChR2</i> -YFP-Mäusen. ....	278
Appendix Tabelle 7: Immunmarkierung mit Antikörpern gegen CCC-Marker an Paraffin- und Gefrierschnitten von C57BL/6J-, <i>Trpm5</i> -Ko- und <i>Trpm5</i> -DTA-Mäusen.....	279
Appendix Tabelle 8: Quantifizierung von TRPM5-positiven Zellen in <i>Whole-mount</i> -Präparaten von <i>Pou2f3</i> -Ko-Mäusen.. ....	280
Appendix Tabelle 9: Körpergewicht von adulten 8-10 Monate alten, männlichen Mäusen der Mauslinie <i>Pou2f3</i> -Ko .....	281
Appendix Tabelle 10: Körpergewicht von adulten 3-40 Monate alten, weiblichen Mäusen der Mauslinie <i>Trpm5</i> -DTA.....	281
Appendix Tabelle 11: Anzahl an markierten Zellen in <i>Whole-Mount</i> -Präparaten von <i>ChAT</i> -eGFP Mäusen. ....	282
Appendix Tabelle 12: Anzahl an TRPM5-positiven Zellen in <i>Whole-mount</i> -Präparaten von SPF und „keimfreien“ Mäusen. ....	284
Appendix Tabelle 13: Anzahl an DCLK1-positiven Zellen pro mm Basalliman in Paraffinschnitten von <i>Tlr</i> -WT und <i>Tlr2</i> -, <i>Tlr4</i> - und <i>Tlr2/4</i> -defizienten Mäusen. ....	286
Appendix Tabelle 14: Anzahl an TRPM5- und ChAT-positiven Zellen in <i>Whole-mount</i> -Präparaten von <i>Myd88</i> -Wt und <i>Myd88</i> -Ko Mäusen. ....	287
Appendix Tabelle 15: PTS-Experimente an Wildtypmäusen.....	288
Appendix Tabelle 16: PTS-Experimente an C57BL6/J-Mäusen mit dem Signalpeptid f-MKKFRW. ....	292
Appendix Tabelle 17: PTS-Experimente an C57BL6/J-Mäusen mit dem Signalpeptid f-MKKFRW in verschiedenen Konzentrationen.....	293
Appendix Tabelle 18: PTS-Experimente an weiblichen 3-4 Monate alten C57BL6/J-Mäusen mit dem Peptid f-MKKFRW von einem zweiten Hersteller. ....	293

Appendix Tabelle 19: Tabelle 19 PTS-Experimente an Wildtypmäusen mit Varianten des Signalpeptides f-MKKFRW.....	294
Appendix Tabelle 20: Bestimmung der CBF nach Applikation von f-MKKFRW.....	295
Appendix Tabelle 21: PTS-Experimente an Wildtypmäusen mit Fpr1- und Fpr2-Inhibitoren .....	296
Appendix Tabelle 22: PTS-Experimente an weiblichen drei Monate alten Fpr1-Knockoutmäusen und korrespondierenden Wildtypmäusen mit f-MKKFRW.....	297
Appendix Tabelle 23: PTS-Experimente FVB/NCrl- und C57BL6/J-Mäusen mit f-MKKFRW. ....	298
Appendix Tabelle 24: Tabelle 24 PTS-Experimente an <i>Fpr3</i> -Knockoutmäusen und korrespondieren Kontrollen - mit f-MKKFRW.....	299
Appendix Tabelle 25: PTS-Experimente an <i>Pou2f3</i> -Ko- und <i>Trpm5</i> -DTA-Mäusen und korrespondieren Kontrollen - mit dem Peptid f-MKKFRW oder f-MKKFKWSI. ....	300
Appendix Tabelle 26: PTS-Experimente an Mäusen defizient für Komponenten der Geschmackswahrnehmungskaskade und korrespondieren Kontrollen - mit dem Peptid f-MKKFRW. ....	302
Appendix Tabelle 27: PTS-Experimente an Mäusen defizient für den Rezeptor <i>Itpr3</i> und korrespondieren Kontrollen - mit 10 µM Muskarin.....	304
Appendix Tabelle 28: PTS-Experimente an 4-5 Monate alten weiblichen C57Bl6/J-Mäusen mit den <i>Tas1r</i> -Agonisten Saccharose und Glutamat.....	305
Appendix Tabelle 29: PTS-Experimente an Mäusen defizient für den Geschmacksrezeptor <i>Tas1r3</i> und korrespondieren homozygoten Wildtyp-Kontrollen mit dem Peptid f-MKKFRW.. ....	306
Appendix Tabelle 30: PTS-Experimente mit Bitterrezeptor-Agonisten .....	307
Appendix Tabelle 31: PTS-Experimente mit Bitterrezeptor-Agonisten Phenylbutazon und Sucralose an weiblichen 3-4 Monate alten C57BL6/J-Mäusen.. ....	307
Appendix Tabelle 32: PTS-Experimente mit Bitterrezeptor-Agonisten 5-PTU und 6-PTU. ...	308
Appendix Tabelle 33: PTS-Experimente mit dem Bitterrezeptor-Agonisten Arbutin in den Konzentration 3, 30 und 300 µM an weiblichen 3-4 Monate alten C57BL6/J-Mäusen.....	308
Appendix Tabelle 34: PTS-Experimente mit dem <i>Tas2r105</i> Agonisten 3-Oxo-C6-HSL.....	309
Appendix Tabelle 35: Tabelle 34 PTS-Experimente mit dem <i>Tas2r105</i> -Agonisten Cycloheximide (0,1 mM).....	310
Appendix Tabelle 36: PTS-Experimente mit dem <i>Tas2r135</i> -Agonisten Allylithiocyanat (AITC) in den Konzentrationen 30 und 300 µM.....	311
Appendix Tabelle 37: PTS-Experimente mit dem <i>Tas2r105</i> , 135, 140, 144-Agonisten Denatonium in verschiedenen Konzentrationen (0,5; 1; 2; 5; 10 mM).....	312

Appendix Tabelle 38: PTS-Experimente mit dem Tas2r105-Agonisten 3-OXO-C12-HSL (100 $\mu$ M).....	312
Appendix Tabelle 39: PTS-Experimente an Mäusen defizient für die <i>Tas2r143</i> , <i>135</i> und <i>125</i> ( <i>Tas2r<sup>-/-</sup></i> ) und homozygoten Wt-Kontrollen ( <i>Tas2r<sup>+/+</sup></i> ) mit f-MKKFRW. ....	315
Appendix Tabelle 40: ACh-Messungen in Überständen von Tracheen mittels HPLC. ....	316
Appendix Tabelle 41: ACh-Messungen in Überständen von Tracheen von <i>ChAT-ChR2-YFP</i> -Mäusen mittels HPLC.....	317
Appendix Tabelle 42: ACh-Messungen in Überständen von Tracheen von <i>ChAT-ChR2-YFP</i> -Mäusen mittels HPLC.....	318
Appendix Tabelle 43: PTS-Experimente mit ChAT-ChR2-Tieren und LED-Licht-Stimulation. ....	319
Appendix Tabelle 44: PTS-Experimente mit <i>Avil<sup>pre</sup>/ChAT<sup>fl</sup></i> -Tieren und f-MKKFRW-Stimulation. ....	320
Appendix Tabelle 45: PTS-Experimente mit Inhibitoren für muskarinische ACh-Rezeptoren.. ....	321
Appendix Tabelle 46: 45 PTS-Experimente an Mäusen defizient für den muskarinischen ACh-Rezeptor 3 ( <i>M3R<sup>-/-</sup></i> ) und Kontrolltieren ( <i>M3R<sup>+/+</sup></i> ). ....	324
Appendix Tabelle 47: PTS-Experimente mit Inhibitoren für NO-Synthasen (L-NAME).....	325
Appendix Tabelle 48: PTS-Experimente an Mäusen defizient für die endotheliale NO-Synthase (eNOS bzw. <i>Nos3<sup>-/-</sup></i> ) und Kontrolltieren ( <i>Nos3<sup>+/+</sup></i> ). ....	326
Appendix Tabelle 49: PTS-Experimente mit dem TAC1R-Inhibitor RP67580. ....	327
Appendix Tabelle 50: PTS-Experimente mit dem nAChR-Inhibitor Mecamylamin und dem Na <sub>v</sub> -Kanal-Inhibitor TTX. ....	328
Appendix Tabelle 51: PTS-Experimente mit bakteriellen Überständen von <i>E. coli</i> .....	329
Appendix Tabelle 52: PTS-Experimente mit bakteriellen Überständen von <i>E. coli</i> an Tracheen von <i>Pou2f3<sup>-/-</sup></i> - und <i>Pou2f3<sup>-/-</sup></i> -Mäusen. ....	330
Appendix Tabelle 53: Auswertung der mikrobiologischen Untersuchung von <i>Trpm5<sup>-/-</sup></i> - und Kontrollmäusen ( <i>Trpm5<sup>+/+</sup></i> bzw. <i>+/-</i> ).....	331
Appendix Tabelle 54: Tabelle 53 Infektionsversuche mit <i>S. pneumoniae</i> an <i>Trpm5-DTA<sup>+/-</sup></i> - und <i>Trpm5-DTA</i> -Tieren.. ....	335

**Appendix Tabelle 1: Anzahl von SCCC und PNEC im Trachealepithel der Maus.**  
Ergänzend zu Abbildung 34.

Mausstamm	Alter (Monate)	Sex	SCCC pro mm <sup>2</sup>	PNEC pro mm <sup>2</sup>
<i>ChAT-eGFP</i>	5	m	283	260
	3	m	273	197
	8	w	335	206
	4	w	221	211
	5	m	549	228
	5	m	221	245
<b>Mittelwert:</b>			<b>314</b>	<b>225</b>
<b>Standardfehler:</b>			<b>50,20</b>	<b>9,89</b>

**Appendix Tabelle 2: Kolokalisation von ChAT-eGFP und ChAT-Antikörpermarkierung in *ChAT-eGFP* Reporterermäusen.** Ergänzend zu Abbildung 36E.

Mausstamm	Alter (Monate)	Sex	ChAT-eGFP	+	+	-
			ChAT-AK	+	-	+
<i>ChAT-eGFP</i>	8	w		128	7	0
	8	w		103	34	2
	8	w		263	44	2
<b>Prozent der angefärbten Zellen:</b>				<b>77</b>	<b>21</b>	<b>1</b>
<b>Standardfehler:</b>				<b>3,92</b>	<b>3,50</b>	<b>0,47</b>

**Appendix Tabelle 3: Kolokalisation von ChAT-eGFP und TRPM5-Antikörpermarkierung in *ChAT*-eGFP Reporter-mäusen.** Ergänzend zu Abbildung 36F.

Mausstamm	Alter (Monate)	Sex	ChAT-GFP	+	+	-
			TRPM5-AK	+	-	+
<i>ChAT</i> - eGFP	8	w		177	8	3
	8	w		113	37	5
	8	w		170	1	3
Prozent der angefärbten Zellen:				88	9	2
Standardfehler:				7,74	7,23	0,52

**Appendix Tabelle 4: Kolokalisation von ChAT-eGFP und DCLK1-Antikörpermarkierung in *ChAT*-eGFP Reporter-mäusen.** Ergänzend zu Abbildung 36G.

Mausstamm	Alter (Monate)	Sex	ChAT-GFP	+	+	-
			DCLK1-AK	+	-	+
<i>ChAT</i> - eGFP	8	w		202	12	2
	8	w		84	4	1
	8	w		217	4	11
Prozent der angefärbten Zellen:				92	4	4
Standardfehler:				2,00	1,40	1,58

**Appendix Tabelle 5: Kolokalisation von Tas2r143-mCherry und TRPM5-Antikörpermarkierung in *Tas2R143*-mCherry Reportermäusen.** Ergänzend zu Abbildung 39.

Mausstamm	Alter (Monate)	Sex	mCherry TRPM5	+	+	-
				+	-	+
<i>Tas2R143</i> -mCherry	5	m		178	6	28
	5	m		182	5	20
	7	m		200	7	17
<b>Prozent der angefärbten Zellen:</b>				<b>87</b>	<b>3</b>	<b>10</b>
<b>Standardfehler:</b>				<b>0,55</b>	<b>0,22</b>	<b>0,56</b>

**Appendix Tabelle 6: Kolokalisation von nativem YFP, antikörperverstärktem YFP (GFP) und TRPM5 in *Chat-ChR2*-YFP-Mäusen.** Ergänzend zu Abbildung 42.

Mausstamm	Alter (Monate)	Sex	YFP-nativ	+	-	-	-	+	Zellen, die nativ YFP-positiv waren plus Zellen, die nur mit AK-Verstärkung sichtbar waren
			YFP-verstärkt	-	+	-	+	+	
			TRPM5-AK	-	-	+	+	+	
<i>Chat-ChR2</i> -YFP	13	m		0	0	12	78	124	202
	2	w		0	8	60	91	41	132
	2	w		0	0	31	45	95	140
	11	m		0	12	26	62	147	209
	2	w		0	1	37	60	28	88
<b>Prozent der angefärbten Zellen:</b>				<b>0</b>	<b>1,2</b>	<b>19,1</b>	<b>36,9</b>	<b>44,0</b>	<b>(80,87)</b>
<b>Standardfehler:</b>				<b>0</b>	<b>0,99</b>	<b>5,0</b>	<b>4,8</b>	<b>9,08</b>	<b>5,0</b>

**Appendix Tabelle 7: Immunmarkierung mit Antikörpern gegen CCC-Marker an Paraffin- und Gefrierschnitten von C57BL/6J-, *Trpm5*-Ko- und *Trpm5*-DTA-Mäusen (n.e. = nicht ermittelt). Ergänzend zu Abbildung 44B und 49B und C.**

Mausstamm	Alter (Monate)	Sex	Zellen pro 2000 $\mu$ M Basallamina					
			ChAT	PLC $\beta$ 2	Villin	DCLK1	GNAT3	TRPM5
C57BL/6J	3	w	4,6	4,1	7,80	5,3	4,8	4,7
	3	w	5,2	4,5	n.e.	5,5	6,2	5,7
	3	w	4,5	4,1	13,7	3,3	4,2	5,0
	3	w	3,5	7,3	10,1	7,4	7,4	7,3
	3	w	4,9	7,0	n.e.	9,9	7,9	9,9
<i>Trpm5</i> -Ko	13	w	4,6	n.e.	10,7	n.e.	7,2	n.e.
	13	w	4,3	n.e.		6,9	5,3	n.e.
	13	w	5,0	n.e.				
	3	m	5,0	5,3	n.e.	4,4	5,2	0
	3	w	5,1	4,2	n.e.	5,0	4,2	0
	3	m	n.e.	4,6	n.e.			
	13	w	n.e.		8,2	n.e.	6,9	n.e.
	13	w	n.e.		11,1	6,8	n.e.	
	3	m	n.e.				6,9	n.e.
<i>Trpm5</i> -DTA	3	m	0	0	3,5	0	0	0
	3	m	0	0	2,7	0	0	0
	Zusätzlich wurden <i>Trpm5</i> -DTA Tiere aus den Infektionsversuchen mit <i>S. pneumoniae</i> ausgewertet. Hier wurden mindestens 3 Longitudinalschnitte mit Antikörpern gegen TRPM5 angefärbt und beurteilt. In keinem der untersuchten Tiere konnten TRPM5-positive Zellen gefunden werden. Dabei handelte es sich um folgende Tiere: <b>3 Monate alt:</b> 5 Weibchen, 3 Männchen; <b>4 Monate alt:</b> 4 Weibchen, 5 Männchen. In Summe wurden 19 <i>Trpm5</i> -DTA Tiere auf das Vorhandensein von TRPM5-positiven Zellen untersucht.							

**Appendix Tabelle 8: Quantifizierung von TRPM5-positiven Zellen in *Whole-mount*-Präparaten von *Pou2f3*-Ko-Mäusen.** Ergänzend zu Abbildung 46C.

Genotyp	Alter (Monate)	Sex	TRPM5- pos- Zellen pro mm <sup>2</sup>
Wildtyp (+/+)	3	m	133
	3	w	258
	3	m	258
Heterozygot (+/-)	3	m	157
	3	f	183
	9	m	245
	9	m	262
	9	m	251
Knockout (-/-)	3	w	0
	3	m	0
	3	w	0
	5	m	0
	5	m	0

**Appendix Tabelle 9: Körpergewicht in Gramm (g) von adulten 8-10 Monate alten, männlichen Mäusen der Mauslinie *Pou2f3*-Ko (MW=Mittelwert).** Ergänzend zu Abbildung 46D.

Genotyp	Körpergewicht in g									MW in g
<b>Wildtyp</b>	33,3	40,5	33,9	33,2						<b>35,2</b>
<b>Heterozygot</b>	38	35,2	34,6	34,5	35,3	39,3	34,3	41,9	27,1	<b>35,6</b>
<b>Knock-out</b>	35,7	32,2	33,1	29,8	39,5	37,3	34	37,5	43,7	<b>35,9</b>

**Appendix Tabelle 10: Körpergewicht in Gramm (g) von adulten 3-40 Monate alten, weiblichen Mäusen der Mauslinie *Trpm5*-DTA (MW=Mittelwert).** Ergänzend zu Abbildung 49D.

Genotyp	KG in g									MW in g
<b>R26-DTA<sup>+/-</sup></b>	23,4	24,5	19,6	21,05	23	20,4	22,2	18,7	20,8	
	18,7	20,5	17,5	17,7	20,5	18				<b>20,61</b>
<b><i>Trpm5</i>-DTA</b>	20,45	22,3	22,6	24,4	18,8	15,7	18,9	18,2		<b>20,2</b>

**Appendix Tabelle 11: Anzahl an markierten Zellen in *Whole-Mount*-Präparaten von *ChAT*-eGFP Mäusen.** Ergänzend zu Abbildung 50.

Alter in Tagen	Sex	ChAT-eGFP <sup>+</sup> -total	Fäche mm <sup>2</sup>	ChAT-eGFP <sup>+</sup> -mm <sup>2</sup>	TRPM5 <sup>+</sup> -total	TRPM5 <sup>+</sup> -mm <sup>2</sup>	%ChAT-eGFP <sup>+</sup> von TRPM5 <sup>+</sup>
0	m	13	9,1	1,4	nicht bestimmt		
0	m	6	9,1	0,7			
0	m	45	9	5	93	10,3	48,4
0	m	109	10	10,9	181	18,2	60,2
0	m	69	5,1	13,7	221	43,8	31,2
0	w	41	6	6,8	143	23,7	28,7
0	w	81	8,5	9,5	143	16,8	56,6
0	w	66	8,8	7,5	111	12,6	59,5
1	m	14	8,5	1,7	nicht bestimmt		
1	m	13	8,5	1,5			
1	m	79	8,9	8,5	164	18,3	48,2
1	w	84	8	10,5	178	18,7	47,2
2	w	38	9,6	3,9	nicht bestimmt		
2	m	18	1,8	1,7			
2	w	76	10	7,6	186	18,7	40,9
2	m	93	8,9	10,5	192	21,6	48,4
2	w	76	6,6	11,6	195	29,7	38,9
2	m	69	7,4	9,3	221	29,8	31,2
4	m	64	10,2	6,3	nicht bestimmt		
4	m	41	12,6	3,3			
4	w	45	12,3	3,7			
6	m	42	10,8	3,9			
6	w	71	11,7	6,1			
8	m	77	14,8	5,2			

<b>8</b>	m	98	13,3	7,4			
<b>9</b>	m	67	10,8	6,2			
<b>9</b>	w	111	11,7	9,5			
<b>10</b>	m	161	8,9	18,3			
<b>10</b>	m	201	15,8	12,7			
<b>10</b>	m	69	9,7	7,1			
<b>10</b>	w	104	14,4	7,2			
<b>14</b>	m	234	18,8	12,5			
<b>14</b>	w	184	16,3	11,3			
<b>14</b>	w	254	15,5	16,4			
<b>14</b>	w	289	18,3	15,8			
<b>24</b>	m	254	15,6	16,3			
<b>24</b>	m	303	18,6	16,3			
<b>24</b>	m	294	18,6	15,8		nicht bestimmt	
<b>24</b>	w	213	16,8	12,6		nicht bestimmt	
<b>34</b>	m	729	22,9	31,9		In diesen Präparaten wurde die Kolokalisation anhand von ~100 Zellen exemplarisch ausgewertet	87,20
<b>34</b>	w	979	24,5	39,9			71,3
<b>78</b>	m	4319	35,7	121,2			87,2
<b>78</b>	w	3580	35,6	100,5			97,2
<b>108</b>	m	3456	40,7	85			95,4
<b>108</b>	m	4331	42,2	102,6	76,8		

**Appendix Tabelle 12: Anzahl an TRPM5-positiven Zellen in *Whole-mount*-Präparaten von SPF und „keimfreien“ Mäusen. Ergänzend zu Abbildung 53B-D.**

Haltungsbedingung	Alter (Tage)	Sex	SCCC pro mm <sup>2</sup>
SPF	7	m	15
			28
			30
			29
			29
			24
			22
Keimfrei	7	m	24
			27
			22
			21
			20
Keimfrei	7	m	20
			34
SPF	33	w	89
			107
			83
			75
Keimfrei	33	w	94
			72
SPF	219	m	351
	219	m	374
	219	m	326
	163	m	300
	233	m	339

<b>SPF</b>	<b>233</b>	<b>w</b>	<b>254</b>
	<b>233</b>	<b>w</b>	<b>322</b>
	<b>179</b>	<b>w</b>	<b>288</b>
	<b>179</b>	<b>m</b>	<b>214</b>
	<b>179</b>	<b>m</b>	<b>131</b>
	<b>179</b>	<b>m</b>	<b>175</b>
	<b>179</b>	<b>w</b>	<b>160</b>
	<b>179</b>	<b>w</b>	<b>214</b>
<b>Keimfrei</b>	<b>175</b>	<b>m</b>	<b>254</b>
	<b>175</b>	<b>w</b>	<b>330</b>
	<b>175</b>	<b>w</b>	<b>252</b>
	<b>175</b>	<b>w</b>	<b>296</b>
<b>Mausstamm</b>	<b>Alter (Tage)</b>	<b>Sex</b>	<b>SCCC pro mm<sup>2</sup></b>
<b>Keimfrei</b>	<b>175</b>	<b>m</b>	<b>186</b>
	<b>175</b>	<b>m</b>	<b>269</b>
	<b>175</b>	<b>m</b>	<b>217</b>
	<b>205</b>	<b>m</b>	<b>248</b>
	<b>135</b>	<b>m</b>	<b>273</b>
	<b>135</b>	<b>w</b>	<b>269</b>
	<b>135</b>	<b>w</b>	<b>279</b>

**Appendix Tabelle 13: Anzahl an DCLK1-positiven Zellen pro mm Basalliman in Paraffinschnitten von *Tlr*-Wt und *Tlr*2-, *Tlr*4- und *Tlr*2/4-defizienten Mäusen. Ergänzend zu Abbildung 54A.**

<b>Mausstamm</b>	<b>Alter (Wochen)</b>	<b>Sex</b>	<b>DCLK1-positive Zellen</b>
<b><i>Tlr</i>-Wt</b>	24	w	4,2
	24	m	4,7
	24	w	5,2
	17	w	4
	24	w	4,4
<b><i>Tlr</i>2-Ko</b>	19	w	0,8
	23	m	1,2
	19	w	3,2
	19	w	2,9
	23	m	3,3
<b><i>Tlr</i>4-Ko</b>	20	w	4,1
	20	w	2,9
	23	m	4
	23	m	2,7
	19	w	1,8
<b><i>Tlr</i>2/4-Ko</b>	21	w	2,9
	21	m	3
	21	w	3,1
	25	w	2,1
	21	w	1,6

**Appendix Tabelle 14: Anzahl an TRPM5- und ChAT-positiven Zellen in *Whole-mount*-Präparaten von *Myd88*-Wt und *Myd88*-Ko Mäusen. Ergänzend zu Abbildung 54B und C.**

<b>Mausstamm</b>	<b>Alter (Wochen)</b>	<b>Sex</b>	<b>TRPM5-positive Zellen pro mm<sup>2</sup></b>	<b>ChAT-positive Zellen pro mm<sup>2</sup></b>
<b><i>Myd88</i>-Wt</b>	12	w	220	123
	12	w	261	118
	12	w	230	109
	23	m	462,	315
	23	m	313	198
	23	m	274	228
	19	m	276	176
	19	m	332	181
	19	m	352	227
	12	w	242	153
	12	w	227	132
	12	w	294	168
<b><i>Myd88</i>-Ko</b>	14	m	231	145
	14	m	220	100
	21	m	114	68
	21	m	186	124
	21	m	249	138
	18	m	253	155
	18	m	247	155
	18	w	136	104
	12	m	142	116
	12	w	152	74

**Appendix Tabelle 15: PTS-Experimente an Wildtypmäusen.** Getestet wurden verschiedene formylierte und nicht formylierte Signalpeptide, sowie synthetische FPR-Agonisten. Ergänzend zu Abbildung 55.

Peptid	Mausstamm	Sex	Alter (Monate)	vor Peptid	nach Peptid	nach ATP	Peptid	ATP
				in $\mu\text{m/s}$			Veränderung in %	
<b>C1-Puffer (vehicle)</b>	ChAT-eGFP	m	2	37,4	24,6	52,5	-34,2	40,2
	C57BL6/J	m	3	39,0	40,5	66,8	3,8	71,2
	C57BL6/J	m	3	41,2	38,5	67,3	-6,4	63,4
	ChAT-eGFP	m	2	46,8	41,5	74,4	-11,2	59,2
	ChAT-eGFP	m	2	19,6	20,6	91,7	4,8	367,3
	C57BL6/J	m	4	61,2	50,9	122,7	-16,9	100,3
	C57BL6/J	w	4	33,2	26,5	113,3	-20,1	241,6
	C57BL6/J	m	5	45,1	48,3	106,8	7,1	136,9
<b>WKYMVm-NH2 (10 <math>\mu\text{M}</math>)</b>	C57BL6/J	w	2	40,0	37,3	86,8	-7,0	116,7
	C57BL6/J	w	5	26,5	35,9	113,3	35,5	327,6
	C57BL6/J	m	6	53,3	53,2	106,8	-0,2	100,4
	ChAT-eGFP	w	7	54,0	53,3	93,8	-11,2	56,3
	C57BL6/J	w	3	52,1	49,0	82,9	-5,8	59,3
<b>WKYMVm-NH2 (100 <math>\mu\text{M}</math>)</b>	C57BL6/J	w	4	72,8	67,8	72,8	-6,9	67,8
	C57BL6/J	w	4	42,6	59,0	42,6	38,6	59,0
	C57BL6/J	m	5	51,3	58,1	51,3	13,3	58,1
	C57BL6/J	w	3	56,2	51,0	56,2	-9,3	51
	C57BL6/J	w	3	79,7	81,6	79,7	2,5	81,6

## 11. Appendix

<b>MWHWAm-NH2</b>	ChAT-eGFP	m	7	38,9	34,2	75,2	<b>-12,1</b>	<b>93,4</b>
	ChAT-eGFP	m	7	51,4	41,4	73,0	<b>-19,5</b>	<b>42,2</b>
	ChAT-eGFP	m	7	39,7	36,2	110,8	<b>-8,9</b>	<b>179,1</b>
<b>f-MGFFIS</b>	ChAT-eGFP	w	3	46,0	43,1	88,3	<b>-6,4</b>	<b>92,0</b>
	ChAT-eGFP	w	2	42,0	48,2	101,6	<b>14,9</b>	<b>141,9</b>
	ChAT-eGFP	m	2	35,3	30,8	86,5	<b>-13,0</b>	<b>144,8</b>
<b>f-MKNFKG</b>	ChAT-eGFP	m	7	47,5	43,0	110,8	<b>-9,4</b>	<b>133,3</b>
	ChAT-eGFP	m	7	48,8	51,7	102,2	<b>6,0</b>	<b>109,6</b>
	ChAT-eGFP	m	7	47,5	39,2	110,8	<b>-17,6</b>	<b>133,3</b>
<b>f-MVMKFK</b>	ChAT-eGFP	m	7	34,1	27,5	73,1	<b>-19,5</b>	<b>114,0</b>
	ChAT-eGFP	m	7	42,6	49,3	102,2	<b>15,6</b>	<b>140,0</b>
	ChAT-eGFP	m	7	58,5	49,2	122,5	<b>-15,9</b>	<b>109,5</b>
	ChAT-eGFP	m	7	41,1	44,2	110,8	<b>7,5</b>	<b>169,8</b>
<b>f-MKFNI</b>	C57BL6/J	w	4	78,0	76,8	119,9	<b>-1,5</b>	<b>53,7</b>
	ChAT-eGFP	m	3	61,5	59,0	91,8	<b>-4,1</b>	<b>49,3</b>
	ChAT-eGFP	m	6	39,0	38,3	75,2	<b>-1,8</b>	<b>92,9</b>
	C57BL6/J	w	3	57,1	49,4	127,8	<b>-13,5</b>	<b>124,0</b>
<b>f-MKKFYS</b>	C57BL6/J	m	4	46,2	38,5	76,6	<b>-16,7</b>	<b>65,9</b>
	C57BL6/J	w	3	56,5	58,2	100,3	<b>2,9</b>	<b>77,4</b>
	C57BL6/J	w	3	56,9	54,9	104,3	<b>-3,5</b>	<b>83,5</b>
	C57BL6/J	w	3	58,1	61,3	90,4	<b>5,5</b>	<b>55,5</b>
<b>f-MKKFLL</b>	C57BL6/J	m	4	51,3	41,4	76,6	<b>-19,4</b>	<b>49,3</b>
	C57BL6/J	w	3	56,5	58,2	100,3	<b>2,9</b>	<b>77,4</b>
	C57BL6/J	w	3	56,9	54,9	104,3	<b>-3,5</b>	<b>83,5</b>
	C57BL6/J	w	3	63,0	65,3	90,4	<b>3,5</b>	<b>43,4</b>

## 11. Appendix

<b>f-MLFYLA</b>	C57BL6/J	w	4	76,8	69,4	119,9	-9,6	56,0
	ChAT-eGFP	m	3	55,9	50,4	91,8	-9,9	64,3
	ChAT-eGFP	m	6	39,6	38,2	75,2	-3,5	90,0
	C57BL6/J	w	3	49,4	54,6	127,8	10,6	158,8
<b>f-MLFKYS</b>	ChAT-eGFP	m	7	47,5	43,0	110,8	-9,4	133,3
	ChAT-eGFP	m	7	48,8	51,7	102,2	6,0	109,6
	ChAT-eGFP	m	7	47,5	39,2	110,4	-17,6	133,3
<b>f-MPKLNR</b>	C57BL6/J	m	5	51,3	41,4	76,6	-19,4	49,3
	C57BL6/J	w	3	34,4	29,4	96,3	-14,7	179,6
	C57BL6/J	w	3	60,2	58,6	82,9	-2,6	37,9
<b>f-MNKKLL</b>	C57BL6/J	m	5	46,2	38,5	76,6	-16,7	65,9
	C57BL6/J	w	3	89,9	88,0	107,5	-2,1	19,7
	C57BL6/J	w	3	35,6	32,5	96,3	-8,6	170,6
<b>f-MKKNLV</b>	C57BL6/J	m	5	36,8	38,5	76,6	4,8	108,4
	C57BL6/J	w	3	63,5	72,4	110,	14,1	73,3
	C57BL6/J	w	4	88,0	86,4	107,5	-1,8	22,2
<b>f-MKKIML</b>	C57BL6/J	m	5	36,8	38,5	76,6	4,8	108,4
	C57BL6/J	w	3	63,5	72,4	110,0	14,1	73,5
	C57BL6/J	w	4	68,0	67,6	98,0	-0,6	44,2
<b>f-MKKYKRLLL</b>	C57BL6/J	w	3	53,8	80,7	120,0	50	90,9
	C57BL6/J	w	3	59,8	66,5	84,6	11,3	44,4
	C57BL6/J	w	3	45,3	50,1	68,5	10,6	60,5
	C57BL6/J	w	3	62,7	67,2	82,8	7,2	24,4
	C57BL6/J	w	4	86,4	92,4	138,1	6,9	60,4
	C57BL6/J	w	4	49,9	55,1	75,4	10,4	51
<b>f-MKKTLSLKN</b>	C57BL6/J	w	3	65,3	73,8	110,0	13,1	35,1
	C57BL6/J	w	3	59,8	57,4	75,4	-4	51

11. Appendix

	C57BL6/J	w	3	70,2	73,4	98,0	4,5	50,6
<b>f- MKKISKFLP</b>	C57BL6/J	w	3	60,8	57,0	84,6	-6,3	44,4
	C57BL6/J	w	3	41,4	45,9	68,5	10,8	60,5
	C57BL6/J	w	3	82,9	83,3	138,1	0,5	60,4
<b>MGFFIS</b>	C57BL6/J	w	4	13,7	15,4	86,2	12,5	528,7
	C57BL6/J	m	5	37,0	32,8	87,7	-11,3	137,3
	ChAT-eGFP	m	3	41,9	44,4	110,8	5,8	164,3
	C57BL6/J	w	3	54,6	48,7	107,2	-10,8	96,2
<b>MKKFRW</b>	C57BL6/J	w	4	12,7	13,2	86,2	3,9	580,8
	C57BL6/J	m	5	46,4	43,3	87,7	-6,7	89,1
	ChAT-eGFP	m	3	40,8	40,3	110,8	-1,2	171,7
	C57BL6/J	w	3	58,2	54,6	107,2	-6,1	84,4
<b>f-MKKFRW</b>	C57BL6/J	w	4	49,5	64,6	97,9	30,7	103,6
	C57BL6/J	m	3	45,2	74,7	96,1	65,1	114,1
	C57BL6/J	m	7	65,8'9	92,8	116,8	40,9	67,3
	C57BL6/J	w	4	34,0	102,7	123,8	202	263,9
	C57BL6/J	w	4	45,1	110,9	91,8	146,1	103,7
	C57BL6/J	w	4	31,0	59,8	80,7	92,8	160,5
	C57BL6/J	w	4	45,2	61,2	108,7	35,4	140,4
	C57BL6/J	w	4	49,1	69,0	88,0	40,6	79,3
<b>f-MKKFRWV</b>	C57BL6/J	w	3	39,9	63,2	85,1	58,6	113,5
	C57BL6/J	w	3	73,3	90,5	133,1	23,5	81,7
	C57BL6/J	w	3	44,1	81,9	80,9	86,0	83,7z
	C57BL6/J	w	3	87,3	88,0	111,0	0,8	27,2
<b>f- MKKFRWV L</b>	C57BL6/J	w	3	53,5	70,1	88,3	30,9	70,8
	C57BL6/J	w	3	33,2	44,8	82,9	35,2	147,3
	C57BL6/J	w	3	29,5	43,0	52,1	45,7	46,0

<b>f- MKKFRWV L</b>	C57BL6/J	w	3	53,4	70,0	76,6	31,0	40,8
-----------------------------	----------	---	---	------	------	------	------	------

**Appendix Tabelle 16: PTS-Experimente an C57BL6/J-Mäusen mit dem Signalpeptid f-MKKFRW. Ergänzend zu Abbildung 56A-C.**

Peptid	Sex	Alter (Monate)	vor vehicle	nach vehicle	nach Peptid	nach ATP	vehicle	Peptid	ATP
			in $\mu\text{m/s}$				Veränderung in %		
<b>f- MKKFRW</b>	w	4	49,9	49,5	64,6	97,9	<b>-0,9</b>	<b>30,7</b>	<b>98</b>
	m	3	52,1	45,2	74,7	96,1	<b>-13,2</b>	<b>65,1</b>	<b>112,4</b>
	m	7	75,0	65,9	92,8	109,1	<b>-12,2</b>	<b>40,9</b>	<b>65,7</b>
	w	4	36,2	34,0	107,4	123,8	<b>-6,1</b>	<b>215,7</b>	<b>263,9</b>
	w	4	46,8	31,7	110,9	91,	<b>-32,2</b>	<b>250</b>	<b>189,7</b>
	w	4	28,7	31,0	59,8	80,7	<b>7,9</b>	<b>92,8</b>	<b>160,5</b>
	w	4	51,5	45,2	61,2	108,7	<b>-12,3</b>	<b>35,4</b>	<b>140,4</b>
	w	4	48,5	49,1	69,0	88,0	<b>1,3</b>	<b>40,6</b>	<b>79,30</b>
	w	4	61,6	53,4	67,5	85,2	<b>-13,3</b>	<b>26,3</b>	<b>59,4</b>
	w	3	66,5	43,0	71,5	116,4	<b>-35,4</b>	<b>66,4</b>	<b>170,9</b>
	w	3	65,2	64,0	110,6	152,2	<b>-1,9</b>	<b>72,6</b>	<b>137,8</b>
	w	3	60,5	56,7	92,1	112,8	<b>-6,3</b>	<b>62,5</b>	<b>99</b>

**Appendix Tabelle 17: PTS-Experimente an weiblichen 3-4 Monate alten C57BL6/J-Mäusen mit dem Signalpeptid f-MKKFRW in verschiedenen Konzentrationen.** Ergänzend zu Abbildung 56D.

Experiment Nr.	vehicle	0,1 µM	1 µM	20 µM	10 µM ATP
	Veränderung in %				
1	-10,0	6,7	18,3	36,0	56,5
2	-13,1	14,9	42,4	103,0	128,1
3	-2,1	-13,1	77,9	95,2	115,8
4	10,8	8,4	15,5	16,2	34,9
5	3,0	6,3	18,2	33,7	60,5
	vehicle	5 µM	10 µM	100 µM	10 µM ATP
	Veränderung in %				
6	-2,2	68,9	75,7	85,9	98,7
7	-10,8	18,3	28,0	41,4	55,3
8	-3,60	24,5	42,6	53,6	125,9
9	-13,8	55,8	59,8	66,3	121,8
10	4,4	80,4	88,3	87,9	147,3

**Appendix Tabelle 18: PTS-Experimente an weiblichen 3-4 Monate alten C57BL6/J-Mäusen mit dem Peptid f-MKKFRW von einem zweiten Hersteller.** Diese Ergebnisse wurden mit den Experimenten, welche in Tabelle 16 dargestellt sind, verglichen. Ergänzend zu Abbildung 56E.

Peptid	vor Peptid	nach Peptid	nach ATP	Peptid	ATP
	in µm/s			Veränderung in %	
<b>f-MKKFRW (Kontrollpeptid)</b>	47,4	63,5	80,1	34,2	53,7
	47,3	61,3	127,8	29,7	124,0
	48,7	73,5	107,2	50,8	84,4
	58,3	74,6	104,3	28,0	83,5
	57,	105,1	122,5	83,1	71,7

**Appendix Tabelle 19: Tabelle 19 PTS-Experimente an Wildtypmäusen mit Varianten des Signalpeptides f-MKKFRW. Ergänzend zu Abbildung 56F.**

Peptid	Alter	Sex	Stamm	vor vehicle	nach vehicle	nach Peptid	nach ATP	vehicle	Peptid	ATP
				in $\mu\text{m/s}$				Veränderung in %		
f-MKKFR	3	w	C57BL6/J	66,5	56,1	84,3	108,5	-15,5	50,1	93,2
	3	w		53,5	41,6	57,5	112,0	-22,2	38,2	169,2
	3	w	$\alpha$ 3-Chrna- WT	70,0	66,6	79,7	95,0	-4,8	19,6	42,6
	3	w		56,2	48,5	110,0	102,4	-13,7	127,1	111,3
	13	w	ChAT- Chr2-tom- WT	47,7	39,3	37,0	131,8	-17,6	30,1	363,1
f- MKKFRY	13	w	ChAT- Chr2-tom- WT	86,	66,3	95,0	149,4	-22,9	43,5	125,5
	9	w		38,3	26,6	51,3	86,8	-30,6	92,7	226,3
	9	w		50,0	45,0	62,1	134,3	-9,8	37,9	198,2
	9	m		32,5	35,5	70,6	151,7	9,1	99,0	327,9
	9	m		75,1	60,2	73,6	148,1	-19,8	22,2	145,8
f- MKKFKW SI	3	w	C57BL6/J	31,5	28,8	54,0	77,1	-8,8	87,8	168,1
	3	w		68,7	51,6	62,3	89,0	-24,9	20,9	72,6
	3	w		50,9	36,6	51,8	101,4	-28,2	41,7	177,2
	3	w		33,8	47,8	54,0	80,3	41,4	13,0	67,8
	3	w		51,2	46,7	69,0	87,8	-8,8	48,0	88,2
f- MKKWR W	3	w	C57BL6/J	66,9	nicht bestimmt	66,0	105,2	nicht bestimmt	-1,4	57,1
	3	w		51,1		48,6	129,9		-4,7	154,4
	3	w		36,9		39,4	91,2		7,0	147,3
f- MKKHRW	3	w	C57BL6/J	60,2	nicht bestimmt	60,4	105,2	nicht bestimmt	0,2	105,1 5
	3	w	C57BL6/J	51,9		56,8	106,4		9,5	106,3 6
	3	w		36,9		35,0	91,2		-5,1	91,17

<b>f- MKRFVWI I</b>	3	w	C57BL6/J	87,1	nicht bestimmt	83,7	108,6	nicht bestimmt	-4,0	47,6
	3	w		103,3		97,3	114,0		-5,8	39,5
	3	w		36,89		46,1	91,2		25,0	147,3

**Appendix Tabelle 20: Bestimmung der CBF an C57BL6/J-Mäusen nach Applikation von f-MKKFRW.** Ergänzend zu Abbildung 57A-B.

Sex	Alter (Monate)	vor Peptid	nach Peptid	nach ATP	Peptid	ATP
		Veränderung in Hz			Veränderung in %	
w	3	5,0	10,6	18,9	111,9	278,7
w	3	7,1	14,7	18,3	108,5	158,9
w	3	8,7	10,4	19,4	20,1	123,3
w	3	9,5	13,9	16,6	46,5	75,5
w	3	13,4	21,3	23,7	59,7	77,1

**Appendix Tabelle 21: PTS-Experimente an Wildtypmäusen mit Fpr1- und Fpr2-Inhibitoren und f-MKKFRW.** Ergänzend zu Abbildung 61A.

Peptid	Alter (Monate)	Sex	Stamm	vor Peptid	nach Peptid	nach ATP	Peptid	ATP
				in $\mu\text{m/s}$			Veränderung in %	
<b>f-MKKFRW</b>  + <b>CyclosporinH</b> und <b>tBoc2</b>	5	m	C57BL6/J	46,5	78,6	87,7	<b>68,8</b>	<b>76,8</b>
	3	m	ChAT-eGFP	50,4	79,4	91,8	<b>57,6</b>	<b>57,2</b>
	5	m	C57BL6/J	48,3	78,7	122,7	<b>62,9</b>	<b>100,3</b>
	4	m	ChAT-eGFP	42,4	64,2	107,9	<b>51,6</b>	<b>119,7</b>
	4	w	C57BL6/J	60,6	102,5	131,6	<b>69,2</b>	<b>94,1</b>
	4	w	C57BL6/J	58,9	96,3	129,6	<b>63,6</b>	<b>88,1</b>
<b>f-MKKFRW</b>  + <b>vehicle</b>	3	w	C57BL6/J	20,3	63,1	86,2	<b>210,5</b>	<b>324,2</b>
	4	w		50,4	70,0	85,2	<b>38,9</b>	<b>69,0</b>
	4	w		43,0	71,5	116,4	<b>66,4</b>	<b>170,9</b>
	4	w		64,0	110,6	152,2	<b>72,8</b>	<b>137,8</b>
	4	w		56,7	92,1	112,3	<b>62,4</b>	<b>98,1</b>

**Appendix Tabelle 22: PTS-Experimente an weiblichen drei Monate alten *Fpr1*-Knockoutmäusen und korrespondierenden Wildtypmäusen mit f-MKKFRW. Ergänzend zu Abbildung 61B.**

Stamm	vor Peptid	nach Peptid	nach ATP	Peptid	ATP
	in $\mu\text{m/s}$			Veränderung in %	
<i>Fpr1<sup>-/-</sup></i>	49,1	66,9	85,0	<b>36,4</b>	<b>73,2</b>
	41,4	59,2	89,0	<b>43,0</b>	<b>115,1</b>
	36,7	57,1	109,0	<b>55,5</b>	<b>197,1</b>
	46,0	72,2	93,0	<b>56,9</b>	<b>102,1</b>
	50,9	67,1	69,5	<b>31,8</b>	<b>36,5</b>
	34,2	46,8	69,6	<b>36,9</b>	<b>103,8</b>
<i>Fpr1<sup>+/-</sup></i>	36,	46,7	71,8	<b>29,9</b>	<b>99,7</b>
	35,5	52,9	67,3	<b>49,1</b>	<b>89,9</b>
	43,6	63,0	69,6	<b>44,6</b>	<b>59,7</b>
	54,6	74,6	88,1	<b>36,7</b>	<b>61,3</b>
	37,6	61,1	79,5	<b>62,7</b>	<b>111,7</b>

**Appendix Tabelle 23: PTS-Experimente FVB/NCrI- und C57BL6/J-Mäusen mit f-MKKFRW.** Ergänzend zu Abbildung 61C.

Alter (Monate)	Sex	Stamm	vor Peptid	nach Peptid	nach ATP	Peptid	ATP
			in $\mu\text{m/s}$			Veränderung in %	
7	w	FVB/NCrI	53,7	73,7	84,1	37,2	56,7
7	w		15,9	52,2	78,1	228,4	391,1
7	m		27,4	97,5	109,6	254,8	300,1
7	m		59,3	116,3	118,5	96,1	99,8
7	w		69,7	92,8	92,7	33,1	33,0
5	m		75,9	91,3	92,1	20,4	21,4
5	m		41,2	75,5	92,0	83,1	123,0
5	m		52,2	80,4	94,3	54,0	80,6
3	w	C57BL6/J	67,2	94,9	117,6	41,2	74,9
3	w		61,7	88,5	117,8	43,4	90,8
3	w		37,6	91,7	107,9	143,9	187,2
5	w		47,4	63,5	80,1	34,2	69,2
5	w		47,3	61,3	127,8	29,7	170,3
5	w		48,7	73,8	107,2	50,8	120,0

**Appendix Tabelle 24: Tabelle 24 PTS-Experimente an *Fpr3*-Knockoutmäusen und korrespondierenden Kontrollen - mit f-MKKFRW. Ergänzend zu Abbildung 61D (n.b. = nicht bestimmt).**

Alter (Monate)	Sex	Stamm	vor Peptid	nach Peptid	nach ATP	Peptid	ATP
			in $\mu\text{m/s}$			Veränderung in %	
3	w	<i>Fpr3</i> <sup>+/+</sup>	53,8	65,8	74,3	<b>22,3</b>	<b>38,2</b>
3	w		44,5	77,2	109,5	<b>73,4</b>	<b>145,9</b>
3	w		42,8	67,2	91,4	<b>57,2</b>	<b>113,8</b>
3	w		48,7	67,0	103,9	<b>37,6</b>	<b>113,4</b>
3	w	<i>Fpr3</i> <sup>+/-</sup>	37,4	65,5	95,1	<b>74,8</b>	<b>154,2</b>
3	w		40,6	53,9	94,8	<b>32,8</b>	<b>133,7</b>
5	m		44,7	54,5	77,1	<b>22,0</b>	<b>72,4</b>
3	m		60,1	123,8	132,5	<b>106,1</b>	<b>120,5</b>
3	m		38,0	55,6	81,2	<b>46,4</b>	<b>113,6</b>
4	m		80,7	98,6	116,1	<b>22,3</b>	<b>43,9</b>
3	w	<i>Fpr3</i> <sup>-/-</sup>	31,6	49,6	69,4	<b>57,0</b>	<b>119,8</b>
3	w		58,5	87,5	115,3	<b>49,7</b>	<b>97,3</b>
5	m		64,7	84,3	108,7	<b>30,2</b>	<b>67,9</b>
3	m		64,9	94,6	94,8	<b>45,8</b>	<b>46,1</b>
3	m		62,9	77,4	87,0	<b>23,1</b>	<b>38,3</b>
3	m		64,1	87,6	n.b.	<b>36,7</b>	<b>n.b.</b>

**Appendix Tabelle 25: PTS-Experimente an *Pou2f3*-Ko- und *Trpm5*-DTA-Mäusen und korrespondierenden Kontrollen - mit dem Peptid f-MKKFRW oder f-MKKFKWSI. Ergänzend zu Abbildung 62.**

Peptid	Alter (Monate)	Sex	Stamm	vor Peptid	nach Peptid	nach ATP	Peptid	ATP
				in $\mu\text{m/s}$			Veränderung in %	
f-MKKFRW	3	m	<i>Pou2f3</i> <sup>+/-</sup>	58,6	74,52	99,5	27,1	69,6
	3	w		75,2	97,6	100,1	29,8	33,2
	3	w		57,4	93,4	96,1	62,8	67,4
	5	w		61,5	81,2	92,7	31,9	50,6
	5	w		47,3	75,8	85,6	60,4	81,6
	3	m		61,4	98,1	106,4	59,6	73,2
	3	m		37,4	70,7	87,2	88,9	132,9
f-MKKFRW	4	w	<i>Pou2f3</i> <sup>-/-</sup>	93,9	96,6	139,6	2,8	48,6
	4	w		54,0	53,4	93,9	-1,2	73,8
	3	m		32,1	43,6	160,2	35,6	398,8
	3	w		49,6	55,6	109,9	12,0	121,3
	4	w		79,9	75,8	118,9	-5,2	48,8
	4	w		71,4	71,7	89,3	0,5	25,0
	4	w		86,7	78,1	104,9	-10,0	21,0
f-MKKFRW	3	w	<i>Trpm5</i> -DTA <sup>+/-</sup>	23,9	45,7	81,5	92,1	240,7
		m		39,8	59,8	67,7	50,0	70,1
		m		45,3	94,2	120,9	108,0	167,1
		m		28,8	43,1	88,6	50,0	208,1
		w		24,7	64,5	88,6	161,3	259,0
f-MKKFRW	3	m	T <i>Trpm5</i> -DTA <sup>-/-</sup>	40,6	48,1	82,6	18,4	103,7
		m		40,9	43,3	106,8	5,9	161,3
		w		33,6	30,0	92,7	-10,7	176,1
		w		25,9	32,1	98,5	23,8	280,3

		w		35,2	38,5	58,8	9,4	67,3
f-MKKFKWSI	3	m	<i>Pou2f3<sup>+/-</sup></i>	55,7	77,4	101,1	38,4	81,7
				31,0	66,2	85,3	113,9	175,4
				32,3	80,4	124,7	148,8	285,9
				33,0	72,9	80,0	120,9	142,5
				64,1	108,2	118,7	68,7	85,0
f-MKKFKWSI	8	w	<i>Pou2f3<sup>-/-</sup></i>	69,5	75,9	133,9	9,2	92,6
		m		67,4	77,3	139,4	14,8	107,0
		w		68,0	75,3	122,6	10,8	80,3
		m		44,6	62,6	126,6	40,4	184,1
		m		56,4	60,5	86,1	7,2	52,6

**Appendix Tabelle 26: PTS-Experimente an Mäusen defizient für Komponenten der Geschmackswahrnehmungskaskade und korrespondierenden Kontrollen - mit dem Peptid f-MKKFRW. Ergänzend zu Abbildung 63B-E und G-H.**

Alter (Monate)	Sex	Stamm	vor Peptid	nach Peptid	nach ATP	Peptid	ATP
			in $\mu\text{m/s}$			Veränderung in %	
4	m	<i>Plc<math>\beta</math>2<sup>+/-</sup></i>	49,6	67,9	103,5	36,8	108,5
4	m		54,4	70,3	97,6	29,3	79,4
4	m		37,6	79,8	90,5	112,6	141,0
4	m		34,2	52,2	74,9	52,6	119,0
4	w		33,3	56,7	95,9	70,4	188,4
3	w		49,4	60,1	87,7	21,7	77,5
3	w		42,9	79,5	73,5	85,6	71,6
3	m		31,2	80,8	89,5	159,3	187,2
4	m	<i>Plc<math>\beta</math>2<sup>-/-</sup></i>	45,6	43,8	87,4	-4,0	91,5
4	m		60,2	65,1	94,8	8,2	57,5
4	w		68,4	66,1	96,2	-3,3	40,6
3	w		21,2	23,6	75,1	11,3	254,7
3	w		55,4	49,2	89,7	-11,2	62,0
3	m		56,3	57,9	69,8	2,9	23,9
3	m		56,7	56,34	76,03	-0,7	34,0
3	m	<i>Itpr3<sup>+/-</sup></i>	59,7	90,0	96,2	50,8	61,1
	m		64,3	75,9	92,1	18,1	43,4
	w		49,6	67,1	84,8	35,3	71,0
	w		60,8	84,6	98,3	39,2	61,6
	m		60,8	77,9	83,4	28,1	37,3
3	m	<i>Itpr3<sup>-/-</sup></i>	59,9	54,7	84,2	-8,7	40,5
	m		70,6	69,9	89,9	-1,0	27,2

3	w		42,0	53,1	93,9	25,0	121,0
	m		73,0	67,9	111,6	-6,9	52,9
	m		50,5	50,6	77,3	0,2	52,9
	w		52,2	55,1	61,8	5,6	18,4
	w		74,2	76,3	92,2	2,7	24,2
10	w	<b>C57BL6/J</b>	45,2	74,7	96,1	65,1	114,1
10	w		65,9	92,8	116,8	40,9	67,3
5	w		50,9	62,4	99,9	22,4	59,4
10	m		45,2	80,0	89,9	77,1	49,3
10	w		53,3	68,2	94,5	27,9	27,5
7	m		46,4	91,6	119,9	97,4	185,5
4	m		<b><i>Trpm5</i><sup>-/-</sup></b>	34,0	33,9	105,4	-0,2
10	m	29,5		30,3	65,4	2,7	127,1
4	w	87,4		91,8	114,9	5,0	29,7
4	w	39,6		42,8	111,3	8,2	116,9
4	w	64,0		62,2	120,7	-2,8	52,6
4	w	62,4		65,0	109,0	4,3	34,0

**Appendix Tabelle 27: PTS-Experimente an Mäusen defizient für den Rezeptor *Itpr3* und korrespondierenden Kontrollen - mit 10  $\mu$ M Muskarin. Ergänzend zu Abbildung 63J.**

Alter (Monate)	Sex	Stamm	vor Muscarin	nach Muscarin	nach ATP	Muscarin	ATP
			in $\mu$ m/s			Veränderung in %	
4	m	<i>Itpr3</i> <sup>+/-</sup>	68,6	120,2	131,1	75,3	91,1
3	w		39,6	67,2	77,8	69,4	96,3
3	w		77,3	113,2	111,8	46,5	44,7
3	w		46,4	67,1	73,5	44,4	58,2
3	w		29,4	61,6	74,2	109,1	152,3
4	w	<i>Itpr3</i> <sup>-/-</sup>	66,2	108,9	116,5	64,6	76,1
4	w		69,3	96,2	91,2	38,9	31,6
3	w		33,3	50,7	67,5	52,3	103,0
4	m		51,3	72,4	80,9	41,1	57,6
4	m		61,7	124,0	122,3	101,0	98,4
3	m		53,8	82,1	98,9	52,5	83,7
3	m		56,4	75,5	76,5	33,8	35,6

**Appendix Tabelle 28: PTS-Experimente an 4-5 Monate alten weiblichen C57Bl6/J-Mäusen mit den Tas1r-Agonisten Saccharose und Glutamat. Ergänzend zu Abbildung 64A.**

Agonist	vor HEPES	nach HEPES	vor Agonisten	nach Agonisten	nach ATP	HEPES	Agonist	ATP
	in $\mu\text{m/s}$					Veränderung in %		
Saccharose 10 mM	42,2	32,7	32,7	20,4	64,2	-22,6	-37,7	146,7
	40,8	40,7	39,5	41,8	34,5	-0,1	6,0	497,6
	46,7	35,4	35,4	34,6	79,8	-24,2	-2,3	196,9
	49,7	37,4	37,4	37,4	74,0	-24,7	0,0	117,4
	45,2	40,6	40,6	35,4	96,8	-10,1	-13,0	197,3
	39,5	41,7	41,7	77,4	72,8	5,7	85,6	21,3
	39,6	40,2	40,2	32,9	84,2	1,5	-18,2	206,0
	27,6	27,4	27,4	26,9	88,6	-1,0	-1,5	226,0
Glutamat 50 mM	im gleichen Versuch wie Saccharose appliziert		35,4	34,6			-23,2	
			37,4	37,4			-21,8	
			40,6	35,4			-5,6	
			41,7	77,4			-18,4	
			40,2	32,9			-11,1	
			27,4	26,9			-1,0	
			32,7	20,4			-19,5	
Glutamat 250 mM			39,5	41,8			-64,4	

**Appendix Tabelle 29: PTS-Experimente an Mäusen defizient für den Geschmacksrezeptor *Tas1r3* und korrespondieren homozygoten Wildtyp-Kontrollen mit dem Peptid f-MKKFRW. Ergänzend zu Abbildung 64B.**

Alter (Monate)	Sex	Stamm	vor f-MKKFRW	nach f-MKKFRW	nach ATP	f-MKKFRW	ATP
			in $\mu\text{m/s}$			Veränderung in %	
18	m	<i>Tas1r3</i> <sup>-/-</sup>	57,7	110,7	133,8	92,0	132,1
18	w		28,77	65,98	97,4	129,3	238,4
18	m		30,3	64,7	84,5	113,6	179,0
18	m		53,3	80,0	140,9	50,1	164,1
18	w		56,6	87,7	135,6	54,9	139,6
18	m	<i>Tas1r3</i> <sup>+/+</sup>	53,4	88,8	145,1	66,5	172,0
18	m		36,7	85,7	154,5	134,0	320,6
18	m		32,2	48,6	96,3	51,0	199,4
18	w		39,4	77,8	120,6	97,5	206,0
18	w		73,5	84,1	130,5	14,5	77,5

**Appendix Tabelle 30: PTS-Experimente mit Bitterrezeptor-Agonisten an weiblichen 3-4 Monate alten C57BL6/J-Mäusen.** Ergänzend zu Abbildung 65A und C.

Substanz	vor	nach	vor	nach	nach	DMSO	Substanz	ATP
	DMSO	DMSO	Substanz	Substanz	ATP			
in $\mu\text{m/s}$						Veränderung in %		
Quinine	52,5	47,1	47,1	44,1	75,9	-10,2	-6,4	44,7
	68,1	77,3	77,3	70,1	105,4	13,6	-9,4	54,8
	57,9	53,5	53,5	55,9	124,8	-7,6	4,4	115,5
	58,6	53,6	52,2	53,7	110,8	-8,4	2,7	89,3
	55,7	52,9	52,9	37,4	85,6	-4,9	-29,4	53,8
2-PT	44,4	65,6	65,6	77,1	76,7	47,7	17,5	132,4
	50,9	70,4	70,4	91,3	82,1	38,3	29,7	113,3
	74,0	77,4	77,4	92,1	82,6	4,6	19,1	32,5
	77,2	53,5	53,5	53,0	53,0	-30,7	-1,0	-3,3
	59,3	73,4	78,9	84,2	80,4	23,7	6,6	86,4

**Appendix Tabelle 31: PTS-Experimente mit Bitterrezeptor-Agonisten Phenylbutazon und Sucralose an weiblichen 3-4 Monate alten C57BL6/J-Mäusen.** Ergänzend zu Abbildung 65E.

vor	nach	vor	nach	vor	nach	nach	Hepes	Phenylbut.	Sucralose	ATP
Hepes	Hepes	Phenylbut.	Phenylbut.	Sucralose	Sucralose	ATP	Hepes	Phenylbut.	Sucralose	ATP
in $\mu\text{m/s}$							Veränderung in %			
54,5	55,1	48,2	46,8	46,9	44,1	77,9	1,0	-2,8	-6,0	42,8
42,3	41,4	41,4	51,1	51,2	42,6	86,3	-2,2	23,5	-15,2	117,5
88,4	86,5	86,5	64,8	62,8	52,3	111,1	-2,2	-25,1	-16,8	155,0
92,3	71,4	71,4	69,3	69,3	54,7	90,2	-22,6	-2,9	-21,2	64,9

**Appendix Tabelle 32: PTS-Experimente mit Bitterrezeptor-Agonisten 5-PTU und 6-PTU an weiblichen 3-4 Monate alten C57BL6/J-Mäusen.** Ergänzend zu Abbildung 65D.

vor Hepes	nach Hepes	vor 5-PTU	nach 5-PTU	vor 6-PTU	nach 6-PTU	nach ATP	Hepes	5-PTU	6-PTU	ATP
in $\mu\text{m/s}$						Veränderung in %				
54,9	57,6	57,6	57,3	60,9	59,5	88,7	5,0	-0,5	-2,3	52,4
43,6	48,8	49,5	45,2	47,1	32,2	76,0	9,8	-8,5	-31,6	113,8
60,2	59,7	59,7	59,6	39,1	31,9	76,2	-1,0	-0,2	-18,4	49,1
64,9	67,4	67,4	70,3	68,9	56,4	83,2	3,8	4,3	-18,2	70,3

**Appendix Tabelle 33: PTS-Experimente mit dem Bitterrezeptor-Agonisten Arbutin in den Konzentration 3, 30 und 300  $\mu\text{M}$  an weiblichen 3-4 Monate alten C57BL6/J-Mäusen.** Ergänzend zu Abbildung 65B.

Substanz	vor Hepes	nach Hepes	vor Arbutin	nach Arbutin	nach ATP	Hepes	Arbutin	ATP
	in $\mu\text{m/s}$					Veränderung in %		
Arbutin 3 mM	nicht appliziert		52,0	46,8	93,2		-10,0	117,8
			45,7	43,2	89,9		-5,5	129,9
	38,4	34,3	34,3	30,0	34,4	-10,6	-12,7	54,1
	96,7	88,7	88,7	66,2	29,4	-8,2	-25,5	33,5
	60,7	60,2	60,2	60,4	25,9	-0,9	0,5	88,9
Arbutin 30 mM	nicht appliziert		42,8	46,7	93,2		9,0	-9,7
			39,1	35,3	85,8		-9,7	-13,7
	Arbutin wurde akkumulativ appliziert, siehe Messungen 3 mM		29,2	27,4		-6,4		
			66,6	48,3		-27,6		
			53,4	40,3		-24,5		
Arbutin 300 mM	60,9	60,5	53,5	20,5	41,6	-0,6	-61,7	60,1
	37,1	36,1	36,1	4,5	24,2	-2,7	-87,5	441,6
	44,8	44,7	45,4	31,5	56,3	-0,3	-30,6	107,5

<b>Arbutin 300 mM</b>	77,9	67,8	67,8	48,2	57,1	-13,0	-29,0	24,4	
	Arbutin wurde akkumulativ appliziert, siehe Messungen akkumulativ 3 mM		29,2	27,4				-6,4	
			66,7	48,3				-27,6	
			53,4	40,3				-24,5	

**Appendix Tabelle 34: PTS-Experimente mit dem Tas2r105 Agonisten 3-Oxo-C6-HSL (1, 10, 100  $\mu\text{M}$ ) an weiblichen 3-4 Monate alten C57BL6/J-Mäusen.** Die verschiedenen Konzentrationen wurden in aufsteigender Reihenfolge im gleichen Experiment appliziert. Ergänzend zu Abbildung 65F.

vor Hepes	nach Hepes	vor 1 $\mu\text{M}$	nach 1 $\mu\text{M}$	nach 10 $\mu\text{M}$	nach 100 $\mu\text{M}$	nach ATP	Hepes	1 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$	ATP
in $\mu\text{m/s}$							Veränderung in %				
86,5	84,3	43,5	37,8	39,5	44,6	103,0	-2,6	-13,0	-9,2	2,6	136,9
64,9	61,5	31,3	30,1	36,1	70,6	135,8	-5,3	-3,7	15,4	125,7	334,3
62,2	62,5	49,7	44,9	47,8	43,8	92,3	0,5	-9,7	-3,9	-11,8	85,6
46,3	46,3	57,6	45,3	53,5	96,3	111,1	-4,8	-21,3	-7,1	67,2	92,8
85,9	85,9	47,9	38,0	48,8	38,8	118,7	-4,6	-20,6	2,0	-19,0	148,1

**Appendix Tabelle 35: Tabelle 34 PTS-Experimente mit dem Tas2r105-Agonisten Cycloheximide (0,1 mM) an C57BL6/J-Mäusen und SCCC-defizienten Mäusen (*Pou2f3*<sup>-/-</sup>) und heterozygoten Kontrolltieren (*Pou2f3*<sup>+/-</sup>). Ergänzend zu Abbildung 66A-C.**

Alter (Monate)	Sex	Stamm	vor Hepes	nach Hepes	vor CHX	nach CHX	nach ATP	Hepes	CHX	ATP
			in $\mu\text{m/s}$					Veränderung in %		
3	w	C57BL6/J	35,9	31,5	31,7	35,5	100,2	-12,2	12,2	182,1
3	w		37,4	38,1	33,0	36,9	75,5	1,9	11,9	104,5
3	w		38,5	39,0	34,7	40,6	76,2	1,3	17,0	87,8
3	w		41,7	36,1	32,5	35,1	95,3	-13,2	8,0	171,4
7	w	<i>Pou2f3</i> <sup>+/-</sup>	59,2	40,4	40,4	49,6	90,6	-31,8	22,9	82,7
7	w		64,1	58,8	58,8	66,5	89,7	-8,2	13,1	34,9
7	w		63,8	64,7	64,7	81,3	128,0	1,5	25,7	57,4
7	w		45,3	44,2	44,2	51,3	139,9	-2,5	16,1	172,9
7	w		55,0	50,1	49,5	54,7	155,3	-9,0	10,3	184,2
7	w	<i>Pou2f3</i> <sup>-/-</sup>	104,5	105,7	105,7	112,8	116,4	1,2	6,6	24,3
7	w		68,8	68,3	68,3	75,0	75,0	-0,7	9,8	30,4
8	w		50,3	44,8	40,7	51,5	54,0	-11,1	26,5	147,0
7	w		52,3	52,3	53,2	57,0	57,0	0,1	7,0	159,3
7	w		87,1	65,9	63,4	69,1	66,7	-24,3	9,0	36,8

**Appendix Tabelle 36: PTS-Experimente mit dem Tas2r135-Agonisten Allylisothiocyanat (AITC) in den Konzentrationen 30 und 300  $\mu\text{M}$ , welche aufsteigend appliziert wurden, an C57BL6/J-Mäusen und SCCC-defizienten Mäusen (*Pou2f3*<sup>-/-</sup>) und heterozygoten Kontrolltieren (*Pou2f3*<sup>+/-</sup>). Ergänzend zu Abbildung 66D-F.**

Alter (Monate)	Sex	Stamm	vor DMSO	nach DMSO	vor AITC 30 $\mu\text{M}$	nach AITC 30 $\mu\text{M}$	vor AITC 300 $\mu\text{M}$	nach AITC 300 $\mu\text{M}$	nach ATP	DMSO	AITC 30 $\mu\text{M}$	AITC 300 $\mu\text{M}$	ATP		
			in $\mu\text{m/s}$					Veränderung in %							
3	w	C57BL6/J	nicht bestimmt		32,8	35,4	33,3	44,4	68,9	nicht bestimmt	7,9	32,8	110,0		
3	w				36,1	42,1	43,1	53,5	88,8		16,9	36,1	146,2		
3	w				45,2	71,2	45,2	86,2	93,2		57,6	45,2	106,4		
3	w				49,8	54,0	53,1	60,9	69,0		8,3	43,2	38,4		
3	w				61,9	57,2	52,4	73,2	127,3		-7,5	59,4	105,8		
3	w				nicht bestimmt			50,5	96,6		63,7	nicht bestimmt		91,4	26,2
3	w							58,6	76,8		67,6			31,0	36,3
3	w							50,0	79,4		102,3			58,7	104,6
3	w							65,0	70,6		110,6			8,6	70,0
3	w				<i>Pou2f3</i> <sup>+/-</sup>	62,9	62,1	nicht bestimmt			54,7	90,0	119,9	nicht bestimmt	-1,3
3	m	49,0	53,4	53,4		74,9	101,7			9,00	40,2	90,4			
4	m	64,8	60,8	60,8		84,0	87,0			-6,2	38,1	43,0			
3	w	36,5	32,8	33,3		59,8	72,7			-10,0	79,6	88,4			
3	w	42,7	36,1	43,1		59,8	91,2			-15,6	38,7	80,5			
6	w	<i>Pou2f3</i> <sup>-/-</sup>	nicht bestimmt		nicht bestimmt		43,1	63,5	52,5	nicht bestimmt	nicht bestimmt	47,3	20,4		
5	w						53,7	73,9	47,1			37,6	-0,1		
5	w						31,7	61,8	46,1			95,2	45,4		
5	w						63,3	91,1	79,1			43,9	25,0		
5	w						60,7	89,4	63,3			47,4	14,4		

**Appendix Tabelle 37: PTS-Experimente mit dem Tas2r105, 135, 140, 144-Agonisten Denatonium in verschiedenen Konzentrationen (0,5; 1; 2; 5; 10 mM) an weiblichen 3-4 Monate alten C57BL6/J-Mäusen. Die verschiedenen Konzentrationen wurden teilweise in aufsteigender Reihenfolge im gleichen Experiment appliziert. Ergänzend zu Abbildung 66G-I.**

vor Hepes	nach Hepes	vor 1 mM	nach 1 mM	nach ATP	Hepes	1 mM	ATP
In $\mu\text{m/s}$					Veränderung in %		
48,7	41,9	41,9	41,8	125,7	-13,9	-0,3	199,9
44,3	43,7	43,7	45,5	81,8	-1,3	4,1	87,1
vor Hepes	nach Hepes	vor 10 mM	nach 10 mM	nach ATP	Hepes	10 mM	ATP
In $\mu\text{m/s}$					Veränderung in %		
54,0	43,9	43,9	58,4	62,0	-1,3	33,0	41,1
74,2	65,2	48,5	66,9	65,3	-18,6	38,0	0,2
37,7	38,0	38,0	38,7	46,3	-12,1	2,0	22,1
74,2	48,5	65,2	66,9	65,3	0,7	2,6	34,7
57,1	54,1	52,8	73,0	53,3	-34,6	38,2	-1,4

vor 0,5 mM	nach 0,5 mM	vor 1 mM	nach 1 $\mu\text{M}$	vor 2 mM	nach 2 mM	Vor 5 mM	nach 5 mM	nach ATP	0,5 mM	1 mM	2 mM	5 mM	ATP
In $\mu\text{m/s}$									Veränderung in %				
34,0	24,4	21,7	21,4	19,0	20,7	22,4	16,0	36,4	-28,1	-1,4	9,0	-28,6	114,71
38,1	26,5	28,1	30,6	26,8	26,9	25,5	49,2	57,0	-30,5	9,0	0,2	92,9	49,48
27,2	20,5	25,9	15,3	20,2	16,9	14,5	19,0	48,6	-24,7	-41,0	-16,1	31,4	228,18
23,9	16,9	17,5	14,1	14,3	12,6	15,6	13,4	29,6	-29,4	-19,4	-11,8	-14,0	78,13

vor Hepes	nach Hepes	Vor 5 mM	nach 5 mM	nach ATP	Hepes	5 mM	ATP
In $\mu\text{m/s}$					Veränderung in %		
39,4	39,8	39,8	39,6	71,5	1,0	-0,7	95,14

11. Appendix

vor Hepes	nach Hepes	vor 10 mM	nach 10 mM	nach ATP	Hepes	10 mM	ATP
In $\mu\text{m/s}$					Veränderung in %		
28,9	30,5	30,5	46,0	27,8	5,5	50,7	-36,28
56,0	60,7	60,7	64,8	73,1	8,3	6,8	10,87
50,2	47,1	47,1	54,5	39,6	-6,1	15,7	-29,18
53,	50,8	50,8	64,6	62,5	-4,9	27,3	6,98
39,	29,4	29,4	29,6	40,8	-25,4	0,6	88,28
77,	67,3	66,5	37,9	54,9	-13,1	-43,0	23,88

**Appendix Tabelle 38: PTS-Experimente mit dem Tas2r105-Agonisten 3-OXO-C12-HSL (100 µM), an C57BL6/J-Mäusen und SCCC-defizienten Mäusen (*Pou2f3*<sup>-/-</sup>) und heterozygoten Kontrolltieren (*Pou2f3*<sup>+/-</sup>). Ergänzend zu Abbildung 66J-L.**

Alter (Monate)	Sex	Stamm	vor Hepes	nach Hepes	vor 3-OXO-C12	nach 3-OXO-C12	nach ATP	Hepes	3-OXO-C12	ATP
			in µm/s					Veränderung in %		
3	w	C57BL6/J	32,0	28,7	28,7	40,0	69,6	-10,3	39,6	142,6
3	w		36,5	34,4	34,4	48,9	75,1	-5,5	42,0	118,1
3	w		29,4	29,0	29,0	38,9	66,7	-1,2	33,9	129,8
3	w		32,6	28,5	28,5	49,7	80,2	-12,8	74,5	181,6
3	w		31,5	34,3	34,3	39,8	78,4	8,9	16,1	128,6
3	w		42,4	40,5	40,5	68,5	47,2	-4,5	69,1	16,6
3	w		45,3	35,5	35,5	54,4	94,7	-21,7	53,3	167,0
3	w		54,2	51,4	51,4	78,5	58,5	-5,2	52,1	13,8
5	m	<i>Pou2f3</i> <sup>+/-</sup>	nicht bestimmt		26,3	35,2	71,5	nicht bestimmt	33,8	172,2
5	w				39,0	53,7	105,4		37,7	170,3
3	w				68,7	62,3	108,1		-9,3	57,4
3	w				48,8	65,9	93,8		35,1	92,2
3	m				57,6	68,9	88,3		19,6	53,3
3	m	<i>Pou2f3</i> <sup>-/-</sup>	nicht bestimmt		62,5	69,9	135,4	nicht bestimmt	11,9	116,7
3	m				43,2	42,5	105,9		-1,8	144,8
3	m				63,6	73,0	87,8		14,87	38,2
3	m				26,1	33,3	49,2		27,5	88,7
3	w				60,2	73,4	99,2		21,9	64,9

**Appendix Tabelle 39: PTS-Experimente an Mäusen defizient für die *Tas2r143*, *135* und *125* (*Tas2r<sup>-/-</sup>*) und homozygoten Wt-Kontrollen (*Tas2r<sup>+/+</sup>*) mit f-MKKFRW. Ergänzend zu Abbildung 67.**

Alter (Monate)	Sex	Stamm	vor	nach	nach ATP	f-MKKFRW	ATP
			f-MKKFRW	f-MKKFRW		Veränderung in %	
			in $\mu\text{m/s}$				
4	m	<i>Tas2r<sup>-/-</sup></i>	36,	48,5	75,9	34,9	110,9
4	m		80,0	89,1	112,77	11,4	41,0
4	m		43,7	54,0	79,4	23,6	81,6
4	m		43,8	46,3	60,8	5,5	38,7
3	m		65,2	60,9	81,3	-6,5	24,7
3	m		43,3	62,3	83,3	43,8	92,2
3	m		52,1	71,2	96,7	36,8	85,6
3	m		62,0	65,0	97,2	4,8	56,8
3	m		84,5	95,4	104,0	12,9	23,0
3	w		55,7	85,8	130,5	54,0	134,1
3	w		70,3	75,4	95,8	7,3	36,2
3	w		33,0	44,9	88,9	36,0	169,1
4	m		<i>Tas2r<sup>+/+</sup></i>	32,1	38,7	55,9	20,6
4	m	33,2		55,1	73,4	66,2	121,5
4	m	49,6		68,1	101,4	37,4	104,7
4	m	56,0		65,5	87,9	25,9	57,0
3	w	37,8		61,2	86,6	62,0	129,3
3	m	46,0		67,1	74,8	45,7	62,4
3	m	49,9		65,0	85,4	30,2	71,0
3	m	66,6		90,7	101,5	36,1	52,4
3	m	64,9		80,7	111,1	24,4	71,3
3	m	43,5		65,1	87,3	49,7	100,8
3	w	53,2		66,4	95,5	24,7	79,5
3	w	65,6		86,3	130,8	31,6	99,3

**Appendix Tabelle 40: ACh-Messungen in Überständen von Tracheen mittels HPLC.**  
Ergänzend zu Abbildung 69.

Alter	Sex	Stamm	f-MKKFRW Applikation 2. Inkubation	1. Inkubation	2. Inkubation	$\Delta$ ACh
				ACh in nM		
3-4 (Monate)	weiblich	C57BL/6J	nein	60,4	29,7	-30,8
				82,1	38,6	-43,5
				16,9	6,4	-10,5
				19,5	12,6	-6,9
				18,8	8,0	-10,8
				38,5	15,8	-22,7
			ja	131,4	192,7	61,3
				25,3	23,5	-1,8
				109,5	289,3	179,8
				46,8	162,6	115,9
				50,1	176,4	126,3
				54,5	104,2	49,6
				8,1	15,0	6,9
				35,7	14,9	-20,8
9,4	11,0	1,6				
4	w	Trpm5 <sup>-/-</sup>	ja	55,0	52,5	-2,5
4	w			252,2	97,3	-154,9
6	w			29,3	30,8	1,5
7	m			18,7	8,3	-10,4
7	m			15,1	5,9	-9,2
8	m			23,6	9,1	-14,5
8	m			32,1	20,4	-11,7

**Appendix Tabelle 41: ACh-Messungen in Überständen von Tracheen von *ChAT-ChR2-YFP*-Mäusen mittels HPLC. Ergänzend zu Abbildung 73A.**

Alter	Sex	Genotyp	LED-Licht Stim. 2.	Epithel entfernt	1. Inkubation	2. Inkubation
					ACh in nM	
5	m	<b>ChR2 -pos.</b>	ja	nein	11,0	21,1
7	f				32,0	51,4
6	f				17,6	60,3
7	f				12,8	25,2
12	m				13,9	77,7
3	f				18,1	106,3
3	f				7,2	48,9
3	f				33,9	22,7
3	f	<b>ChR2 -neg.</b>	ja	nein	18,1	59,1
3	m				14,7	57,0
4	w				40,8	29,2
4	w				34,5	27,9
4	w				26,6	28,2
3	w				24,6	21,3
12	m	<b>ChR2 -pos.</b>	nein	nein	21,7	88,3
3	f				33,8	83,4
3	m				21	34,2
4	w				17,5	19,1
3	w				18,9	13,3
4	w				29,6	24,6

**Appendix Tabelle 42: ACh-Messungen in Überständen von Tracheen von *ChAT-ChR2-YFP*-Mäusen mittels HPLC. Ergänzend zu Abbildung 73B.**

Alter	Sex	Genotyp	LED-Licht Stim. 2.	Epithel entfernt	1. Inkubation	2. Inkubation
					ACh in nM	
5	m	<b>ChR2 -neg.</b>	ja	nein	11,1	6,4
6	m				15,5	10,3
5	w				13,1	8,7
6	w				5,9	4,2
5	w	<b>ChR2 -neg.</b>	ja	ja	18,8	7,1
5	m				31	11,2
5	m				31	14,1
6	m				32,8	14,3
5	f				28,2	11,6
5	m	<b>ChR2 -pos.</b>	ja	nein	5,9	15,4
5	m				7,2	13,5
6	m				7,2	16,3
6	f				7,2	16,8
5	m	<b>ChR2 -pos.</b>	ja	ja	22,1	10
6	m				48,8	19,4
6	m				42,2	18,8
5	f				39,6	20,7
5	f				18,4	12

**Appendix Tabelle 43: PTS-Experimente mit *ChAT-ChR2-YFP*-Tieren und LED-Licht-Stimulation.** Ergänzend zu Abbildung 73C.

Alter (Monate)	Sex	Stamm	vor LED	nach LED	nach ATP	LED	ATP
			PTS in $\mu\text{m/s}$			Veränderung in %	
4	m	<b><i>ChR2-</i> <b>pos.</b></b>	46,4	68,5	107,6	47,8	132,0
			44,8	75,8	112,8	69,3	151,9
			42,1	55,2	82,3	31,1	95,5
			37,9	43,5	65,5	14,8	72,8
4	m	<b><i>ChR2-</i> <b>neg.</b></b>	30,2	20,8	84,6	-31,3	180,0
			55,4	48,9	96,3	-11,7	74,0
			106,6	105,8	147,7	-0,7	38,6
			51,6	36,0	96,3	-30,2	86,5

**Appendix Tabelle 44: PTS-Experimente mit *Avi<sup>cre</sup>/ChAT<sup>fl</sup>*-Tieren und f-MKKFRW-Stimulation.** Ergänzend zu Abbildung 74.

Alter (Monate)	Sex	Stamm	vor	nach	nach	nach	f-MKKFRW	Muskarin	ATP
			f-MKKFRW	f-MKKFRW	Muskarin	ATP			
			in $\mu\text{m/s}$				Veränderung in %		
4	m	<i>ChAT-Advillin fl/+</i>	51,4	67,4	82,9	86,3	31,2	61,4	68,0
4			57,7	78,1	112,3	127,2	35,3	94,7	120,4
5			41,8	61,7	73,2	83,3	47,7	75,0	99,3
4			61,7	88,4	94,4	101,4	43,2	53,1	64,4
4			51,3	71,6	80,4	80,8	39,5	56,7	57,6
7			43,6	68,9	nicht bestimmt	97,1	57,9	nicht bestimmt	122,6
7			55	71,8		133,8	30,6		144,3
3	m	<i>ChAT-Advillin fl/fl</i>	59,1	64,8	64,6	116,6	9,7	87,4	97,3
3			41,3	47,8	53,3	109,1	15,9	131,9	164,5
3			30,8	33,8	33,7	58,0	10,0	65,8	88,7
4			91,1	100,3	97,6	158,3	10,1	60,4	73,8
4			55,2	47,5	51,2	92,3	-14,0	49,8	67,2
7			60,3	64,6	nicht bestimmt	149,6	7,1	nicht bestimmt	144,79
7			w	65,5		61,2	163,5		-6,6

**Appendix Tabelle 45: PTS-Experimente mit Inhibitoren für muskarinische ACh-Rezeptoren.** Ergänzend zu Abbildung 75A-C, E-G.

Alter (Monate)	Sex	Stamm	Inhibitor	Stimulus	vor	nach	nach ATP	Stimulus	ATP			
					Stimulus	Stimulus				in $\mu\text{m/s}$		Veränderung in %
3	weiblich	C57BL/6J	nein	f-MKKFRW	48,2	92,8	101,6	92,3	96,3			
3					32,9	66,0	86,5	100,6	175,0			
4					47,7	78,1	108,1	63,8	102,6			
3					50,9	62,4	99,9	22,4	59,4			
3					45,2	80,0	89,9	77,1	49,3			
3					53,3	68,2	94,5	27,9	27,5			
3			46,4		91,6	119,9	97,4	185,5				
4			Atropin		36,7	54,5	67,5	48,7	83,9			
4					56,6	56,2	87,2	-0,7	39,2			
3					42,9	58,6	71,5	36,5	36,3			
3					37,9	46,4	48,0	22,6	35,3			
3					47,8	54,5	70,7	14,0	33,4			
3					66,7	64,9	89,0	-2,7	40,3			
3					65,3	70,7	75,1	8,2	26,7			
3					weiblich	C57BL/6J	nein	Muskarin	32,9	90,2	100,0	173,9
			67,3						103,1	125,4	53,2	86,3
	43,3	79,3	85,7	83,1					98,0			
	58,2	96,8	104,2	66,2					79,1			
	72,9	70,1	99,6	-3,8			36,6					
	66,3	67,6	166,6	2,1			151,4					
	43,7	59,3	92,7	35,6			112,2					
	4-DAMP	Muskarin	64,0	64,5			95,5		0,7	49,1		
			41,7	50,4			106,8		20,8	155,9		

3	weiblich	C57BL/6J	nein	f-MKKFRW	45,1	70,8	99,8	57,0	121,2
					45,4	59,4	80,8	30,9	78,2
					32,9	76,5	100,0	132,2	203,7
					67,3	85,1	125,4	26,5	86,3
					43,3	70,1	85,7	61,8	98,0
					58,2	108,8	104,2	87,0	79,1
			4-DAMP		59,6	69,0	84,3	15,9	41,4
			66,5		67,4	99,6	1,5	49,8	
			66,3		73,4	166,6	10,8	151,4	
			43,7		54,1	92,7	23,8	112,2	
			64,0		63,9	95,5	-0,2	49,1	
			41,8		47,2	106,8	12,9	155,6	
3	weiblich	C57BL/6J	nein	f-MKKFR	48,8	53,3	80,3	9,4	64,8
					29,3	50,2	96,7	71,0	229,9
					36,9	61,2	123,9	65,8	235,9
					21,3	60,5	70,7	184,7	232,7
					25,2	50,4	61,7	100,0	144,8
			Atropin		55,3	58,9	99,0	6,5	78,9
			63,3		65,8	83,2	4,0	31,5	
			76,2		87,4	147,1	14,6	93,0	
			65,5		62,9	138,6	-4,0	111,5	
			53,3		60,8	120,1	14,2	125,4	
3	weiblich	C57BL/6J	nein	f-MKKFRY	38,9	84,9	121,8	118,1	37,7
					45,9	51,5	105,9	12,2	105,5
					31,7	67,4	98,3	112,9	45,8
					71,1	100,4	111,9	41,1	12,3
					45,7	66,7	96,0	45,9	43,9

					28,8	55,4	69,2	92,3	25,0
			<b>Atropin</b>		69,6	73,7	101,6	6,0	37,9
					55,4	86,8	108,5	56,5	49,4
					44,0	50,2	80,0	14,0	64,7
					54,2	60,4	107,8	11,6	78,3
					48,4	55,6	89,2	14,8	68,7
					55,6	56,2	92,3	1,0	64,3
3	weiblich	C57BL/6J	nein	f-MKKFKWSI	46,8	90,5	106,0	93,2	126,4
					39,3	66,0	89,5	67,9	127,7
					42,7	85,1	97,8	99,4	129,2
					54,8	91,4	103,1	66,7	88,0
					47,5	76,2	92,9	60,5	95,7
					45,5	49,5	80,5	8,6	76,8
			Atropin		38,3	58,1	81,9	51,9	113,9
			49,0		65,8	93,1	34,4	90,1	
			45,3		53,3	93,1	17,8	105,7	
			93,5		88,4	114,4	-5,4	22,4	
			62,1		64,1	100,0	3,2	61,1	

**Appendix Tabelle 46: 45 PTS-Experimente an Mäusen defizient für den muskarinischen ACh-Rezeptor 3 ( $M3R^{-/-}$ ) und Kontrolltieren ( $M3R^{+/+}$ ). Ergänzend zu Abbildung 75D.**

Alter (Monate)	Sex	Stamm	vor	nach	nach	f-MKKFRW	ATP
			f-MKKFRW	f-MKKFRW	ATP	f-MKKFRW	ATP
			in $\mu\text{m/s}$			Veränderung in %	
4	w	$M3R^{+/+}$	38,7	86,8	127,3	124,3	229,0
			22,7	78,8	102,2	246,8	349,8
			54,2	93,5	136,3	72,6	151,6
			61,3	88,3	120,2	44,1	96,1
			62,8	87,2	97,4	38,8	55,0
			51,4	79,9	100,7	55,4	95,8
			34,6	107,3	134,2	210,5	288,5
4	w	$M3R^{-/-}$	41,0	49,5	113,6	20,8	177,3
			38,4	38,9	87,9	1,2	128,8
			57,8	69,0	104,7	19,2	81,0
			29,1	42,3	133,3	45,5	358,5
			72,7	65,8	121,3	-9,5	66,8
			59,9	67,1	89,2	12,1	48,9

**Appendix Tabelle 47: PTS-Experimente mit Inhibitoren für NO-Synthasen (L-NAME).**  
Ergänzend zu Abbildung 76A.

Alter (Monate)	Sex	L-NAME	vor	nach	nach ATP	f-MKKFRW	ATP
			f-MKKFRW	f-MKKFRW			
			in $\mu\text{m/s}$			Veränderung in %	
5	w	nein	34,0	102,7	93,1	202,0	178
5			45,1	110,9	108,9	146,1	195
5			31,0	59,8	147,6	92,8	104
5			45,2	61,2	122,0	35,4	107
5			49,1	69,0	70,6	40,6	120
4			74,0	97,8	84,2	32,2	40
5	w	Ja	33,5	83,6	123,8	149,3	263,9
5			36,9	85,9	91,8	132,9	103,7
5			72,4	104,9	80,7	44,9	160,5
5			59,1	110,7	108,7	87,5	140,4
5			32,1	44,0	88,0	37,3	79,3
4			60,3	75,0	108,3	24,3	46,4

**Appendix Tabelle 48: PTS-Experimente an Mäusen defizient für die endotheliale NO-Synthase (eNOS bzw. *Nos3*<sup>-/-</sup>) und Kontrolltieren (*Nos3*<sup>+/+</sup>). Ergänzend zu Abbildung 76B-D.**

Alter (Monate)	Sex	Genotyp	vor	nach	nach ATP	f-MKKFRW	ATP
			f-MKKFRW	f-MKKFRW			
			in $\mu\text{m/s}$			Veränderung in %	
4	m	<i>Nos3</i> <sup>+/+</sup>	41,3	85,9	124,1	108,2	200,8
			46,0	73,5	102,7	59,7	123,1
			37,9	50,8	111,1	34,0	193,3
			33,3	58,5	94,8	75,5	184,5
			70,5	92,6	117,3	31,3	66,4
			45,4	97,8	138,9	115,4	206,1
4	m	<i>Nos3</i> <sup>-/-</sup>	47,7	73,7	81,6	54,5	71,0
			40,7	65,2	78,3	60,1	92,5
			58,3	75,9	103,6	30,2	77,8
			37,7	52,6	78,1	39,5	107,2
			59,2	89,3	95,4	50,7	61,0
			46,7	67,6	100,2	44,7	114,5

**Appendix Tabelle 49: PTS-Experimente mit dem TAC1R-Inhibitor RP67580.** Ergänzend zu Abbildung 77D.

Alter (Monate)	Sex	TAC1R-Inhibitor RP67580	vor	nach	nach	f-	ATP
			f- MKKFRW	f- MKKFRW	ATP	MKKFRW	ATP
			in $\mu\text{m/s}$			Veränderung in %	
4	w	nein	56,8	102,1	122,4	79,7	115,5
			68,4	82,3	84,4	20,4	23,5
			40,3	99,0	110,5	145,7	174,2
			50,4	73,1	79,4	45,0	57,5
			43,4	90,3	125,0	107,8	175,8
4	w	ja	28,1	80,9	92,0	188,2	227,6
			54,8	72,0	107,3	31,4	95,8
			47,5	72,1	73,9	51,6	55,5
			48,1	78,6	85,6	63,4	78,1
			63,2	75,0	90,4	18,7	43,1

**Appendix Tabelle 50: PTS-Experimente mit dem nAChR-Inhibitor Mecamylamin und dem Na<sub>v</sub>-Kanal-Inhibitor TTX. Ergänzend zu Abbildung 77E. Die Kontrollen ohne Inhibitor sind bereits in Tabelle 46 beschrieben.**

Alter (Monate)	Sex	Inhibitor	vor	f-	nach	f-	nach ATP	f-	ATP
			MKKFRW		MKKFRW		Veränderung in %		
			in µm/s				Veränderung in %		
5	w	Mecamylamin	48,6		125,9		116,4	159,2	139,6
			66,6		110,6		126,6	66,0	89,9
			80,7		126,0		152,8	56,2	89,4
			45,9		57,0		80,6	24,3	75,7
			35,7		46,1		48,9	29,1	36,9
			48,6		74,2		81,9	52,7	68,4
5	w	TTX	42,01		76,89		110,4	83,0	162,7
			23,09		64,6		74,3	179,8	221,9
			33,33		67,06		113,8	101,2	241,5
			40,09		53,84		77,5	34,3	93,3
			38,02		81,6		88,0	114,6	131,5
			48,61		74,21		105,3	52,7	116,5

**Appendix Tabelle 51: PTS-Experimente mit bakteriellen Überständen von *E. coli*.** Überstände wurden in verschiedenen Verdünnungen eingesetzt (1:1000 – 1:10), *E. coli* wurden so modifiziert, dass diese das Protein MgrB überexprimieren, oder *E. coli* ohne Überexpression von MGRB. Ergänzend zu Abbildung 78A und B.

MgrB	vor	nach	nach	nach	nach	1:1000	1:100	1:10	ATP
	Überstand	1:1000	1:100	1:10	nach ATP				
in $\mu\text{m/s}$						Veränderung in %			
Überexprimierend	44,6	50,9	57,0	62,7	94,7	14,1	27,8	40,7	112,5
	31,8	34,1	34,6	42,5	74,6	7,4	8,9	33,8	134,6
	70,9	84,8	89,7	86,4	97,3	19,7	26,5	21,8	37,3
	54,4	64,9	69,0	73,8	102,2	19,4	26,8	35,7	87,9
WT	45,8	39,3	42,0	48,9	135,6	-14,0	-8,2	9,6	204,2
	53,5	50,5	49,3	53,8	96,6	-5,6	-7,8	0,4	80,5
	58,0	61,9	51,9	64,1	88,4	6,8	-10,5	10,6	52,5
	65,3	62,6	63,6	60,7	91,6	-4,2	-2,5	-7,0	40,3

**Appendix Tabelle 52: PTS-Experimente mit bakteriellen Überständen von *E. coli* an Tracheen von *Pou2f3<sup>+/-</sup>*- und *Pou2f3<sup>-/-</sup>*-Mäusen.** Überstände von MgrB-überexprimierenden *E. coli* und Kontrollmedium wurden in der Verdünnung 1:10 eingesetzt. Ergänzend zu Abbildung 78C und D.

Sex	Alter (M)	Genotyp	vor	nach	nach	nach	Medium	Überstand 1:10	ATP
			Medium	Medium	Überstand 1:10	ATP			
			in $\mu\text{m/s}$				Veränderung in %		
w	8	<i>Pou2f3<sup>+/-</sup></i>	59,0	48,3	72,7	97,4	-18,2	50,6	101,7
w	8		66,9	56,9	79,0	106,0	-14,9	38,8	86,2
w	10		52,9	50,9	70,1	101,7	-3,8	37,8	99,9
w	4		64,2	60,4	75,1	103,7	-6,0	24,5	71,8
m	4		81,6	68,8	101,5	121,7	-15,7	47,6	77,0
w	8	<i>Pou2f3<sup>-/-</sup></i>	54,6	48,5	48,6	81,0	-11,1	0,3	67,2
w			99,0	86,7	88,4	123,1	-12,5	2,0	42,0
w			54,4	49,9	35,2	84,2	-8,2	-29,5	68,7
m			64,3	62,8	63,1	124,5	-2,4	0,5	98,3
m			75,6	53,0	64,8	127,3	-29,9	10,8	117,9

**Appendix Tabelle 53: Auswertung der mikrobiologischen Untersuchung von *Trpm5*<sup>-/-</sup>- und Kontrollmäusen (*Trpm5*<sup>+/+</sup> bzw. <sup>+/-</sup>). Untersucht wurde die Besiedlung mit *Bordetella Pseudohinzii* im respiratorischen System. Ergänzend zu Abbildung 79.**

Genotyp	Alter (Monate)	Sex	Score		
			Rachenabstrich	Trachea	Lunge
<i>Trpm5</i> <sup>+/+</sup>	2	m	3	3	0
	3	m	2	2	0
	2	w	3	3	0
	4	w	3	0	0
	4	w	2	3	0
	3	w	3	3	1
	3	w	3	3	1
	3	w	0	2	1
	3	w	3	3	1
	3	w	3	3	1
	3	w	3	3	1
	3	w	2	3	nicht bestimmt
	3	w	2	2	
	4	m	1	3	
	4	m	2	0	
	4	w	1	3	0
	4	w	0	3	0
	4	m	3	3	0
	4	m	2	2	0
	5	w	0	2	0
	5	w	0	2	0
	6	w	1	0	0
	15	m	0	1	0

	15	w	1	0	0
	15	w	0	1	1
	15	m	1	2	0
<i>Trpm5<sup>+/-</sup></i>	11	m	1	nicht bestimmt	nicht bestimmt
	15	m	1	1	bestimmt
	11	m	2	nicht bestimmt	
	11	w	2		
	8	w	1	0	0
	8	w	0	1	0
	8	m	1	2	0
	8	w	2	3	0
	3	w	3	1	nicht bestimmt
	3	w	3	2	
	3	w	3	2	
	6	w	1	0	0
	6	w	1	1	0
	12	m	1	0	0
	12	w	0	2	0
	12	w	1	2	0
	<i>Trpm5<sup>-/-</sup></i>	4	m	3	3
11		m	0	3	0
4		m	3	3	1
4		m	3	3	0
4		m	3	3	1
4		m	3	3	nicht bestimmt

<i>Trpm5<sup>-/-</sup></i>	3	w	3	3	1
	3	w	3	3	1
	3	w	3	3	3
	3	w	3	3	1
	3	w	3	3	2
	3	w	2	3	nicht bestimmt
	3	w	2	3	
	4	m	3	3	
	4	m	1	3	
	4	m	3	1	
	4	w	0	0	0
	4	w	0	0	0
	4	m	2	3	0
	4	m	1	3	3
	4	w	0	0	0
	5	m	2	1	0
	5	m	0	3	0
	15	w	1	1	nicht bestimmt
	10	m	1	1	
	11	m	1	1	
	11	m	1	1	
	9	w		3	
	15	w	0	nicht bestimmt	
	15	w	3		
	15	w	3		
	15	w	1		
	15	w	1		

<i>Trpm5<sup>-/-</sup></i>	5	m	0	3	
	4	m	1	3	
	4	m	3	3	
	4	w	1	3	
	4	w	2	2	
	5	m	2	3	1
	5	m	2	1	0
	5	w	3	0	0

**Appendix Tabelle 54: Tabelle 53 Infektionsversuche mit *S. pneumoniae* an *Trpm5*-DTA<sup>+/-</sup>- und *Trpm5*-DTA-Tieren.** Diese wurden intranasal infiziert und für 10 Tage 2x täglich beobachtet. Körpergewicht und Körpertemperatur wurde bestimmt sowie das Allgemeinverhalten beobachtet. Tiere die eine Gewichtsabnahme >20% vom Ausgangsgewicht, eine Körpertemperatur <35°C oder eine sehr veränderte Atmung oder Allgemeinbefinden aufwiesen wurden umgehend euthanasiert. Ergänzend zu Abbildung 80.

Genotyp	Alter (Wochen)	Sex	euthanasiert	Zeitpunkt	CFU Blut	histologische Untersuchung	Grund für Euthanasie			
							Gewicht	Atmung	Verhalten	Temperatur
<i>Trpm5</i> -DTA <sup>+/-</sup>	10	w	x	72h	1540000	x	x			
	10	w	x	96h	n.b.		x			
	10	w	x	72h	n.b.		x			
	9	w	x	96h	24000	x	x			
	9	w	x	72h	n.b.		x			
	9	w			0	x	nicht euthanasiert			
	9	w	x	96h	260000	x			x	
	9	w	x	72h	7900000	x		x	x	
	16	m	x	60h	17850	x	x			
	16	w	x	72h	n.b.		x			
	16	w	x	144h	7000	x	x			
	16	w			0	x	nicht euthanasiert			
	14	w			0	x	nicht euthanasiert			
	14	m	x	96h	850	x	x			
	14	w	x	108h	1850	x	x			
	14	w	x	84h	800	x	x			
	14	w	x	96h	2800	x	x			
14	w	x	84h	7950	x	x				

<b>Trpm5-DTA</b>	10	m	x	72h	250000	x		x		
	10	w	x	120h	7400	x			x	
	9	w	x	60h	1375000	x	x			
	9	w	x	72h	n.b.		x			
	9	w			0	x	nicht euthanasiert			
	9	m	x	132h	7050	x			x	x
	9	m	x	72h	n.b.	x	x			
	16	m			0	x	nicht euthanasiert			
	16	m			0	x	nicht euthanasiert			
	16	w	x	84h	3900	x				
	16	w			0		nicht euthanasiert			
	14	m	x	72h	4150	x				
	14	w			0		nicht euthanasiert			
	14	w	x	84h	n.b.	x	x			
	14	m	x	72h	1450	x	x			
	14	m	x	84h	n.b.	x	x			
	14	m	x	96h	1120000	x	x			

## 12. Danksagung

Zuallererst möchte ich mich von ganzem Herzen bei Herrn Prof. Dr. Wolfgang Kummer bedanken. Einerseits natürlich für die Bereitstellung des Themas aber vielmehr für die unermüdliche Unterstützung während meiner Promotion. Er ist mir in vielen Dingen ein Vorbild geworden. Seine Begeisterung für wissenschaftliche Themen und sein enormes Wissen sind einzigartig. Ich werde immer an die Zeit in der Anatomie zurückdenken und mich fragen, wie kann eine einzelne Person so viel Wissen in sich tragen und trotzdem so bodenständig sein.

Ich möchte mich auch bei Frau Prof. Dr. Trenzcek dafür danken, dass Sie sich dazu bereit erklärt hat, die Betreuung meiner Doktorarbeit zu übernehmen. Schon während meines Studiums hat Sie es durch ihre interessanten Kurse geschafft, mich für die Biologie zu begeistern.

Ich möchte mich auch bei Frau Prof. Dr. Gabriela Krasteva-Christ bedanken, welche mir besonders zu Beginn meiner Promotion das Thema der „Bürstenzelle“ nähergebracht hat.

Ich möchte mich auch bei allen KollegInnen in der Anatomie bedanken, ohne sie wäre meine Arbeit nur schwer möglich gewesen. Besonderer Dank gilt vor allem dem „Technischen Personal“: Silke Wiegand, Martin Bodenbenner-Türich, Tamara Papadakis, Claudia Tag und Petra Mermer. Ohne euch wäre die Zeit sicherlich nicht so „spannend“ gewesen und ich wäre wahrscheinlich währenddessen verhungert oder mir wären die Tupperdosen ausgegangen. Ich möchte mich aber auch bei allen WissenschaftlerInnen bedanken, die mich in meiner Arbeit unterstützt haben. Besonderer Dank gilt Dr. Patricia Schmidt, Dr. Aya Sultanaova, Dr. Klaus Deckmann, Dr. Wafaa Mahmoud, Dr. Krupali Poharkar, Dr. Christina Nassenstein, Dr. Maryam Keshavarz und Dr. Uwe Pfeil und allen anderen MitarbeiterInnen am Institut in den verschiedenen Stockwerken, welche ich vergessen habe zu erwähnen. Ich bedanke mich auch ausdrücklich bei Frau Berger für Ihre stetige Unterstützung.

An dieser Stelle möchte ich bei meinen Eltern und Großeltern bedanken, welche es mir überhaupt ermöglicht haben, studieren zu können. Besonderer Dank gilt meiner Schwester Kristin Perniß, die mich immer unterstützt hat. Mein Dank gilt auch meiner Cousine Astrid und meinen Patenkindern Mathieu und Feodor, durch euch hatte ich auch mal etwas anderes im Kopf außer Wissenschaft.

Ich bedanke mich bei meinen Freunden, besonders denen, die das Schicksal außerwählt hat dieses Werk Korrektur lesen zu dürfen. Besonderer Dank gilt Dr. Franziska Serafin, Dr. Annemarie Wolf, Dr. Friedrich Wilhelm Bernd Reusswig, Elisabeth Jürgens, Dr. Christiane Pleuger und Dr. Katrin Richter. Ohne euch wäre das Ganze eine grammatikalische Katastrophe geworden.

*„Ich widme diese Arbeit meinem Großvater Helmut Perniß. Ich habe dich stets bewundert und denke du wärst stolz auf mich gewesen, diese Herausforderung geschafft zu haben.“*

## 13. Erklärung

„Ich Alexander Perniß erkläre: Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Ich stimme einer evtl. Überprüfung meiner Dissertation durch eine Antiplagiat-Software zu. 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.“

Gießen, den 29.03.2022

Alexander Perniß