

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg

Einfluss der Bürstenzellen auf die mukoziliäre Clearance im menschlichen respiratorischen Epithel der Trachea

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2024

vorgelegt von:
Thomas Patrick Husnik
geb. am: 13.10.1997 in München

Tag der Promotion: 02. Juni 2025
Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Matthias Hannig
Berichterstatter Prof. Dr. Gabriela Krasteva-Christ
Prof. Dr. Robert Bals
Prof. Dr. Barbara M. Braunger

Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
1. Zusammenfassung.....	1
1.1 Deutsche Version.....	1
1.2 Englische Version	2
2. Einleitung.....	4
2.1 Trachea.....	4
2.2 Bürstenzellen.....	6
2.3 Stickstoffmonoxid und seine Rolle bei Bitterstoffkaskade	11
2.4 Zielsetzung der Arbeit	12
3. Material und Methoden	14
3.1 Materialien.....	14
3.1.1 Verwendete Stoffe	14
3.1.2 Verwendete Geräte	16
3.1.3 Verwendete Labormaterialien	17
3.1.4 Lösungen und Puffer	18
3.2 Untersuchung der PTS an murinen Gewebe	19
3.2.1 Mäuse	19
3.2.2 Versuchsvorbereitungen.....	19
3.2.3 Organentnahme.....	23
3.2.4 Messung des Partikeltransports	23
3.3 Untersuchung der PTS an humanen Gewebe	26
3.3.1 Körperspender.....	26
3.3.2 Versuchsvorbereitung.....	27
3.3.3 Trachea Exzision und Epithelvorbereitung.....	27
3.3.4 Messung des Partikeltransports	28
3.4 Statistische Methoden und Datenanalyse	29
3.5 Histologische Darstellung der Trachea.....	31
3.5.1 Herstellung der Präparate	31
3.5.2 Färbung der Präparate	32
4. Ergebnisse	36
4.1 PTS-Erhöhung nach der Zugabe von Denatonium	36
4.1.1 Rolle von Bürstenzellen für die NO-Vermittelte Steigerung der PTS nach der Zugabe von Denatonium	37
4.1.2 Rolle von Bürstenzellen für die ACh-Vermittelte Steigerung der PTS nach der Zugabe von Denatonium	38
4.1.3 Rolle der TRPM5-Kanäle für die Denatonium-Vermittelte Steigerung der PTS	39
4.2 Zugabe von Chinin.....	40
4.2.1 Rolle von Bürstenzellen für die NO-Vermittelte Steigerung der PTS nach der Zugabe von Chinin.....	41
4.2.2 Rolle von Bürstenzellen für die ACh-Vermittelte Steigerung der PTS nach der Zugabe von Chinin.....	42
4.3 PTS-Erhöhung nach der Zugabe von weiteren Bitterstoffen	43
4.4 Einfluss von [Ca²⁺]_i und [Ca²⁺]_e-Konzentration auf PTS	44
4.5 Immunhistologische Darstellung	45
4.5.1 Immunfluoreszenz-Analyse	45

5. Diskussion.....	48
5.1 Post mortem Intervall	48
5.2 Entnahme des Epithels	49
5.3 Bitterstoffkaskade der BC in der menschlichen Trachea	50
5.4 Einfluss von verschiedenen Faktoren auf die MC beim Menschen.....	55
5.5 Vergleich der Sensitivität der TAS2R auf Chinin	56
5.6 Schlussfolgerung und Ausblick.....	57
6. Abbildungsverzeichnis	58
7. Abkürzungsverzeichnis	60
8. Tabellenverzeichnis	62
9. Literaturverzeichnis	63
10. Veröffentlichung	83
11. Dank	84
12. Lebenslauf.....	85

Zusammenfassung

1.1 Deutsche Version

Die Trachea ist ein Schlüsselorgan des Atmungssystems, das für die Leitung, Erwärmung und Befeuchtung der Atemluft verantwortlich ist. Ihre Oberfläche ist mit Flimmerhärchen und Schleim ausgekleidet, welche über die mukoziliäre Clearance effizient Fremdpartikel und Mikroorganismen entfernen. Bei Mäusen wurde gezeigt, dass die Bürstenzellen, welche mit dem Bittergeschmacksrezeptor TAS2R ausgestattet sind, eine zentrale Rolle bei der Regulation der mukoziliären Clearance darstellen. Sie reagieren auf Bitterstoffe und initiieren dadurch Schutzmechanismen, welche durch die Freisetzung von Acetylcholin initiiert werden. Dieses wirkt parakrin auf die zilienträgenden Zellen und erhöht dadurch die Zilienschlagfrequenz, was zu einer gesteigerten mukoziliären Clearance führt. *Bis dato* ist nur wenig über die menschlichen Bürstenzellen in der Trachea bekannt und die einzigen Studien stammen aus den oberen Atemwegen. Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, ob die menschliche Bittergeschmackstransduktionskaskade ähnlich wie bei Mäusen cholinerg verläuft und ob diese Kaskade ebenso NO-abhängig ist, wie es zuvor von Lee et al. (2012) im nasalen Epithel nachgewiesen wurde.

Die Untersuchung der mukoziliären Clearance in murinem und menschlichem Trachealgewebe hat gezeigt, dass Bitterstoffe wie Denatonium und Chinin die Geschwindigkeit des Partikeltransports signifikant steigern können. Dieser Effekt konnte durch die Blockade von cholinergen und NO-Signalwegen mittels Atropin, Mecamylamin und L-Name aufgehoben werden. Diese Ergebnisse beschreiben erstmalig die entscheidende Bedeutung der cholinergen und NO-Signalwege in den Bürstenzellen bei der Regulierung der mukoziliären Clearance in der menschlichen Trachea. Zudem wurde die Beteiligung des TRPM5-Kanals durch den Einsatz des spezifischen Inhibitors TPPO überprüft, wobei keine Steigerung der Partikeltransportgeschwindigkeit nach der Stimulation durch Bitterstoffe festgestellt wurde. Dies beweist zum ersten Mal eine spezifische Funktion des TRPM5-Kanals für die Regulation der mukoziliären Clearance in der menschlichen Trachea.

Diese Befunde wurden unter standardisierten experimentellen Bedingungen erzielt und die Datenanalyse erfolgte mit Hilfe der Software GraphPad Prism. Die Untersuchung der Gewebestruktur und die Identifizierung von Bürstenzellen im Trachealgewebe wurden durch Hämatoxylin-Eosin-Färbung und immunhistochemische Analysen ermöglicht, wobei DCAMKL1 als spezifischer Marker für Bürstenzellen diente und deren Darstellung erlaubte.

Unsere Ergebnisse bieten neue Einblicke in die Mechanismen der Regulation der mukoziliären Clearance in der menschlichen Trachea und unterstreichen die Rolle der Bürstenzellen darin. Sie erweitern unser Verständnis der körpereigenen Abwehrmechanismen gegen respiratorische Pathogene und könnten grundlegend neue therapeutische Ansätze zur Behandlung von Atemwegserkrankungen eröffnen, indem sie spezifische zelluläre Ziele für zukünftige pharmakologische Interventionen aufzeigen.

1.2 Englische Version

Impact of Tuft Cells on Mucociliary Clearance in the Human Respiratory Epithelium of the Trachea

The trachea is a key organ of the respiratory system, responsible for conducting, warming, and humidifying the inhaled air. Its surface is lined with cilia and mucus, which efficiently remove foreign particles and microorganisms through so-called mucociliary clearance driven by the active beat of the cilia. In mice, tuft cells equipped with the bitter taste receptors (e.g., TAS2R105/108) were shown to play a central role in regulating mucociliary clearance. They respond to bitter substances and initiate protective mechanisms that are induced by the release of acetylcholine. This acts on ciliated cells paracrinally, thereby increasing the frequency of the ciliary beating, leading to enhancement of the mucociliary clearance. To date, little is known about human tuft cells in the trachea, and the only studies come from the upper airways. The aim of this thesis was to determine whether the human bitter taste transduction cascade operates similarly to that in mice involving cholinergic signaling and whether this cascade is also NO-dependent, as has previously been demonstrated by Lee et al. (2012) for the nasal epithelium.

The investigation of mucociliary clearance in murine and human tracheal tissue showed that bitter substances such as denatonium and quinine could significantly increase the speed of particle transport. This effect was abolished by blocking cholinergic and NO signaling pathways upon application of atropine, mecamylamine, or L-Name, respectively. These results describe for the first time the central role of cholinergic and NO signaling pathways in human tuft cells in the regulation of mucociliary clearance. Furthermore, the involvement of the TRPM5 channels was assessed using a specific inhibitor, TPPO, where no increase in particle transport speed was observed after the stimulation by bitter substances. This shows for a first time a specific role for TRPM5 channels in the regulation of mucociliary clearance in the human trachea.

These findings were obtained under standardized experimental conditions, and data analysis was conducted using GraphPad Prism software. The examination of tissue structures and the identification of tuft cells in the tracheal tissue were facilitated by hematoxylin-eosin staining and immunohistochemical analyses employing antibodies directed against the tuft cell marker DCAMKL1.

These results provide new insights into the mechanisms of regulation of the mucociliary clearance in the human trachea and highlights the role of tuft cells in it. They expand our understanding of the body's defense mechanisms against respiratory pathogens and could potentially open up fundamentally new therapeutic approaches for treating respiratory diseases by identifying specific cellular targets for future pharmacological interventions.

2. Einleitung

2.1 Trachea

Die Atemwege lassen sich in einen luftleitenden und einen gasaustauschenden Abschnitt unterteilen [1]. Zu den luftleitenden Abschnitten gehören die Nase, der Kehlkopf, die Trachea, die Bronchien, die Bronchiolen und die terminalen Bronchioli [2]. Die gasaustauschenden Abschnitte umfassen die respiratorischen Bronchioli und die Alveolen [2]. Diese Arbeit konzentriert sich auf den luftleitenden Abschnitt, insbesondere auf die Trachea, ein etwa 12 cm langes röhrenförmiges Organ, das eine Verbindung zwischen dem Larynx und den Hauptbronchien herstellt [3,4]. Die Hauptfunktion der Trachea besteht darin, die eingeatmete Luft zu leiten, zu befeuchten und zu erwärmen [1,5]. Eine weitere wesentliche Funktion ist es, eingedrungene Partikel und Pathogene aus den Atemwegen zu entfernen [5].

Die Trachea, lässt sich anatomisch in zwei Hauptabschnitte unterteilen [1]:

- Pars cervicalis: Dieser Teil beginnt unterhalb des Ringknorpels (*Cartilago cricoidea*), ungefähr auf der Höhe des 6. Halswirbelkörpers, und erstreckt sich bis zur oberen Thoraxöffnung (*Apertura thoracis superior*) [6]. Er liegt im Halsbereich und ist durch seine Nähe zu wichtigen vaskulären und nervösen Strukturen gekennzeichnet [1].
- Pars thoracica: Dieser Abschnitt erstreckt sich von der oberen Thoraxöffnung bis zur Bifurkation der Trachea, wo sie sich in die zwei Hauptbronchien aufteilt [2]. Im Brustbereich ist die Trachea von wesentlichen Strukturen wie dem Herzbeutel und großen Blutgefäßen umgeben.

Im Bereich der Pars cervicalis verlaufen dorsolateral zur Trachea wichtige anatomische Strukturen wie die *Arteria carotis communis*, die *Vena jugularis* und der *Nervus vagus*, eingehüllt in die *Vagina carotica* [5]. Vor der Luftröhre befindet sich die *Lamina praetrachealis* der Halsfaszie. Hier liegt zwischen der Faszie und der Trachea die Schilddrüse [1,4,6]. Hinter der Trachea grenzt der Ösophagus an, was den anatomischen Raum für den *Sulcus oesophagotracheale* schafft. In diesem Sulcus, der zwischen diesen beiden Hohlorganen verläuft, findet sich der *Nervus laryngeus recurrens*, welcher für die Innervation des Kehlkopfes essenziell ist [4]. Die anatomische Nähe dieser Strukturen zur Trachea unterstreicht ihre Bedeutung für chirurgische Eingriffe und medizinische Diagnosen, da Veränderungen oder Erkrankungen der Trachea oft auch benachbarte Organe und Gewebe beeinflussen können [7]. Ein Beispiel dafür ist die Tracheotomie, bei welcher der *Nervus laryngeus recurrens* beschädigt werden kann, was zur Heiserkeit oder sogar Atemnot führen kann [8].

Das Stützgerüst der Trachea besteht aus 16-20 hufeisenförmigen hyalinen Knorpelspannen (*Cartilagine tracheales*), die durch ringförmige Bänder aus kollagenem Bindegewebe, sogenannten Ligamenta anularia, miteinander verbunden sind [2]. Die hintere Wand der Trachea ist hingegen nur aus Bindegewebe (*Paries membranaceus*) und glatter, quer verlaufender Muskulatur (*M. trachealis*) aufgebaut [1]. Der Durchmesser beträgt 13-22 mm und kann durch die Muskulatur aktiv verändert werden, insbesondere während des Schluckens. In der Region des vierten Brustwirbelkörpers teilt sich die Trachea an der Trachealbifurkation (*Bifurcatio tracheae*) in zwei Hauptbronchien (den rechten und linken Hauptbronchus) unterschiedlicher Stärke und Länge auf [2]. An dieser Gabelung befindet sich die sagittal orientierte *Carina tracheae*, welche in das Innere der Trachea hineinragt [6].

Die Wand der Trachea lässt sich in drei Schichten gliedern [5]:

- *Tunica mucosa*
- *Tunica fibro-musculo-cartilaginea*
- *Tunica adventitia*

In der ersten Schicht, der sogenannten *Tunica mucosa*, finden sich die *Lamina epithelialis* und die darunter liegende bindegewebige *Lamina propria* [2,5]. Die *L. epithelialis* besteht aus einem mehrreihigen hochprismatischen Flimmerepithel, welches auch als respiratorisches Epithel bezeichnet wird [3] und enthält mindestens 12 verschiedene Zelltypen, die spezialisierte Funktionen erfüllen [9]. Darunter befinden sich die Bürstenzellen (BC), die unter anderem für die Wahrnehmung chemischer Reize zuständig sind [10], sowie Flimmerzellen, die mit Kinozilien ausgestattet sind und kontinuierlich Schleim sowie Fremdpartikel aus den Atemwegen heraus bewegen [11,4]. Zwischen den zilientragenden Zellen befinden sich die Becherzellen, welche Schleim produzieren und zur Feuchtigkeitserhaltung sowie zum Partikelfang beitragen. Sie heben sich durch ihre spezifische Färbung und Form von den umliegenden Zellen ab. Zusätzlich gibt es in dieser Schicht die Basalzellen, welche als Stammzellen für die Zellerneuerung sorgen, und neuroendokrine Zellen [11,12,10].

Die *Lamina propria*, eine Bindegewebsschicht unter dem Epithel der Trachea, zeichnet sich durch ihr reichhaltiges Kollagenfasernetz aus [1]. Diese Schicht beherbergt eine Vielzahl von Immunzellen, darunter Lymphozyten und Plasmazellen, welche für die Abwehr von Krankheitserregern essenziell sind [13]. Ebenfalls präsent sind elastische Fasern, die zur strukturellen Integrität und Flexibilität der Trachea beitragen. In der *Lamina propria* befinden sich zudem Drüsenendstücke der seromukösen *Glandulae tracheales*, die ähnlich den Becherzellen

ein muzinhaltiges Sekret produzieren [1]. Dieses Sekret wird auf die Oberfläche des Epithels abgegeben und spielt eine Schlüsselrolle bei der Feuchtigkeitserhaltung und dem Einfangen von Fremdpartikeln [2]. Darüber hinaus enthält die *Lamina propria* zahlreiche afferente Nervenfasern, welche als Dehnungsrezeptoren dienen und für die Auslösung des "Ausatmung-Reflexes" verantwortlich sind [14].

Die *Tunica fibromusculocartilaginea* beinhaltet eine Struktur aus hyalinem Knorpel, dessen Enden durch die quer verlaufenden, glatten Muskelfasern des M. trachealis verbunden sind [5]. Diese Muskelfasern umschließen die posteriore Öffnung des Knorpels und bilden so den trachealen Muskelring [6]. Zusätzlich ist in dieser Schicht ein umfangreiches Bindegewebe vorhanden, welches sich zwischen und um die nicht komplett geschlossenen Knorpelspannen schlingt und die Strukturen stabilisiert [1,10]. In dieser Schicht befinden sich zudem große Blut- und Lymphgefäße [5]. Das Knorpelgewebe wird an seinen Rändern von einem schmalen Bindegewebssaum, dem Perichondrium, umgeben [10].

Die äußere Schicht, die *Tunica adventitia*, ist aus Fett und lockerem, kollagenem Bindegewebe zusammengesetzt [10]. Sie erlaubt die Verbindung mit benachbartem Gewebe und sichert die Beweglichkeit der Trachea während des Schluckens und Hustens [1].

2.2 Bürstenzellen

Bürstenzellen, auch bekannt als Mikrovilli-tragende Zellen, erfüllen bei Mäusen wichtige Funktionen als Chemosensoren in verschiedenen Körperbereichen [15,16,17]. Diese cholinergen Zellen sind ebenfalls im Atemwegssystem zu finden [11] und zeichnen sich durch mikroskopische Ausläufer aus, die ihnen ein bürstenartiges Aussehen verleihen und somit namensgebend sind [15,17,18,19]. Neben ihrer Präsenz im respiratorischen Epithel finden sich BC auch im Epithel des gesamten Magen-Darm-Traktes, in den Gallenwegen sowie im Pankreasgang [20]. Ihr Anteil an der Gesamtheit der Epithelzellen beträgt bei Mäusen etwa 1%, was sie zu einem seltenen Zelltyp macht [17]. Ein weiteres charakteristisches Merkmal der murinen BC ist die Expression von Bittergeschmacksrezeptoren TAS2R (Taste Rezeptor Typ 2) und Cholinacetyltransferase (ChAT), einem Enzym, welches für die Synthese von Acetylcholin (ACh) verantwortlich ist [16,17,21].

Über Bürstenzellen bei Mäusen ist viel bekannt, während Informationen über menschliche respiratorische Bürstenzellen begrenzt sind. Die einzigen Arbeiten, die sich mit menschlichen

respiratorischen Bürstenzellen befassen, sind die von Robert Lee [22,23]. Diese wurden jedoch nicht an explantierten Zellen, sondern an Air-Liquid Interface Kulturen durchgeführt. Die cholinerge Eigenschaft der Bürstenzellen wurde in diesen Arbeiten nicht überprüft. In unserer Arbeit wollen wir daher die Präsenz von Bürstenzellen im menschlichen respiratorischen Epithel der Trachea mittels Immunhistochemie an explantierten Geweben darstellen und die cholinerge Eigenschaft der BC durch gezielte Inhibition vor der Zugabe von Bitterstoffen nachweisen.

Hollenhorst et al. (2022) wiesen darauf hin, dass es bei der Stimulation von murinen BC durch Bitterstoffe zur Aktivierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren TAS2-R kommt [15]. Diese Rezeptoren sind in zahlreichen Gewebetypen des Körpers vertreten, darunter im Mund, in der Nase, in der Lunge, im Herzen sowie im Magen- und Darmtrakt [24,25,26] und spielen eine Schlüsselrolle in mehreren biologischen Funktionen [24,26]. Auf der Zunge führt die Aktivierung von TAS2-Rezeptoren zur Wahrnehmung von Bittergeschmack, eine evolutionär entwickelte Fähigkeit, die Wirbeltieren hilft, potenziell gefährliche Substanzen zu erkennen und zu meiden [27,28].

Bislang wurden beim Menschen 29 verschiedene Isoformen der TAS2-Rezeptoren identifiziert [26]. Ihr Polymorphismus ermöglicht es ihnen, eine Vielzahl von Molekülen zu erkennen, darunter Substanzen, die von dem Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* freigesetzt werden, sowie verschiedene Bitterstoffe [22,24]. In der Studie von W. Meyerhof et al., veröffentlicht im Jahr 2009, wurde die Interaktion von mehreren Bitterstoffen mit 25 Isoformen der menschlichen TAS2R analysiert, um individuelle Antwortmuster zu charakterisieren [29]. Sieben Jahre später, im Jahr 2016, untersuchte die AG um Lossow, Meyerhof et al. die Reaktionsmuster von 21 murinen Isoformen der TAS2R auf Bitterstoffe [27]. In den nachfolgenden Tabellen ist das in den genannten Studien ermittelte Reaktionsmuster für die in der vorliegenden Promotionsarbeit verwendeten Bitterstoffe dargestellt (s. Tabelle 1 und 2). Diese umfassen Denatonium (Den), Chinin (Chin), Diphenidol (Dip) und Chlorpheniramin (Chlo).

Tabelle 1: Reaktionsprofile von 25 humanen hTAS2R, die mit Bitterstoffen stimuliert wurden [29].

	1	3	4	5	7	8	9	10	13	14	16	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	60
Den	-	-	#	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	#	-	-	#	#	-	-	-	-
Chin	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-
Dip	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-
Chlo	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-

+ Antwort; - keine Antwort; # in der vorliegenden Studie bestätigt zuvor bekannter Agonist

Tabelle 2: Reaktionsprofile von 21 murinen mTAS2R, die mit Bitterstoffen stimuliert wurden [27].

	105	108	109	110	113	114	115	117	119	120	121	122	123	125	126	135	137	138	139	140	144
Den	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+
Chin	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+
Dip	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+
Chlor	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

+ Antwort; - keine Antwort

Die Erkennung von Bitterstoffen bei murinen BC wird durch die Aktivierung des G-Protein-gekoppelten Rezeptors TAS2R initiiert, was zur Aktivierung von α -Gustducin und zur Spaltung des G-Proteins in α - und β/γ -Untereinheiten führt [30]. Die β/γ -Untereinheit aktiviert die Phospholipase C (PLC β 2), die PIP2 in die sekundären Botenstoffe IP3 und Diacylglycerol spaltet [30]. IP3 öffnet die Kalziumkanäle in der Membran des endoplasmatischen Retikulums, was den Ca²⁺-Austritt und die Erhöhung der intrazellulären [Ca²⁺]_i-Konzentration bewirkt [30,31]. Dies führt zur Öffnung des TRPM5-Kanals, bekannt als transienter Rezeptorpotenzial-Kationenkanal der Unterfamilie M Mitglied 5. Dieser Kanal wird selektiv in chemosensorischen Zellen, Geschmackszellen und pankreatischen β -Zellen exprimiert [32,33,34,35], wo er kürzlich als Regulator für die Sekretion von Insulin identifiziert [32] und als Marker in BC etabliert wurde [29,30,36,37]. Diese Kanäle sind am besten charakterisiert in den Geschmacksknospen, wo sie in den Typ-II Zellen exprimiert werden und, wie bereits beschrieben, selektiv durch einen Anstieg des intrazellulären [Ca²⁺]_i-Konzentration aktiviert werden. Dies ermöglicht durch einströmende, einwertige Kationen eine Depolarisation der Zelle und führt zur Freisetzung des Haupttransmitters ATP und der damit verbundenen Ausschüttung des Neurotransmitters ACh [38]. Dadurch sind sie an der nachgeschalteten Aktivierung und Regulierung der Signalwege nicht nur der TAS2R, sondern auch der TAS1R beteiligt und führen zur Wahrnehmung von Bitter, Süß- und Umamigeschmack [32,33,34]. Denatonium und andere Bitterstoffe führen somit zu einer nachgeschalteten Downstream Aktivierung dieser Kanäle [30,39]. In chemosensorischen Zellen des respiratorischen Epithels der Maus wurde diese Kaskade ebenfalls nachgewiesen [16]. Hierbei führt jedoch eine Aktivierung dieser Kaskade zu einer Ausschüttung des Signalmoleküls ACh, was in Nase und Trachea der Maus identisch ist [16,40]. Die Kaskade des respiratorischen Epithels des Menschen ist weitgehend unbekannt. Wir vermuten jedoch, dass sie der bei Mäusen ähnelt.

ACh ist ein essenzieller Neurotransmitter im zentralen und peripheren Nervensystem, der eine Schlüsselrolle bei der Übertragung von Nervensignalen spielt [41]. Im zentralen Nervensystem ist ACh beteiligt an kognitiven Funktionen wie Lernen, Gedächtnis und Aufmerksamkeit [42]. Im peripheren Nervensystem wirkt ACh als Neurotransmitter an den neuromuskulären Verbindungen, wo es die Muskelkontraktion steuert, und in vielen parasympathischen Nerven, die eine Vielzahl von inneren Organen innervieren [43]. Im menschlichen Nasenepithel entfaltet ACh durch seine sowohl parakrine als auch autokrine Wirkungen die Aktivierung von Acetylcholinrezeptoren, die in nikotinische und muskarinische Rezeptoren unterteilt sind [44,45,46]. Die Aktivierung kann erregende oder hemmende Wirkung haben [41]. Die parakrine Wirkung von ACh auf den angrenzenden Flimmerzellen [47,44] wird hauptsächlich durch muskarinerge M1- und M3-Rezeptoren vermittelt, die eine aktivierende Rolle spielen, während der muskarinerge M2-Rezeptor eine hemmende Funktion ausübt [4,18]. Die Aktivierung der zuerst genannten Rezeptoren hat einen bedeutenden Einfluss auf die Sekretion von Chlorid-Ionen, Mukus und die Regulation der Zilienschlagfrequenz (CBF) [48], da der Calciumeinstrom durch spannungsgesteuerte Calciumkanäle [49] zu einer Anhebung des CBF-Niveaus führt. Diese Steigerung der mukoziliären Clearance [16,50] wirkt beispielsweise der bakteriellen Infektion durch *Pseudomonas aeruginosa* [15,51] entgegen. ACh wird durch das Enzym Acetylcholinesterase zügig abgebaut, was eine feine Regulation der Neurotransmission ermöglicht [52,53]. Die Balance von ACh im Körper ist entscheidend für gesunde neurologische Funktionen. Dysbalancen oder Störungen in der Signalübertragung können zu verschiedenen neurologischen Erkrankungen führen, wie zum Beispiel zur Alzheimer-Krankheit oder zur *Myasthenia gravis* [41].

Es wurde bereits gezeigt, dass das von Trachealbürstenzellen produzierte ACh [18] eine wesentliche Rolle bei der Steigerung der Partikeltransportgeschwindigkeit (PTS) durch Denatonium in Trachealepithelgewebe von Wildtyp-Mäusen spielt [16]. Hollenhorst et al. (2020) demonstrierten, dass die durch Denatonium bewirkte Steigerung der PTS an murinem Gewebe durch die Blockade der Acetylcholinrezeptoren mittels spezifischer Inhibitoren - Mecamylamin für nikotinische Acetylcholinrezeptoren (nAChRs) in einer Konzentration von 100 μM und Atropin für muskarinische Acetylcholinrezeptoren (mAChRs) bei 50 μM - aufgehoben werden kann.

NAChRs sind eine Klasse von ligandengesteuerten Ionenkanälen, die eine wichtige Rolle in der Signalübertragung im zentralen und peripheren Nervensystem spielen [54,55]. Sie bestehen aus fünf Untereinheiten, welche eine zentrale Pore bilden, durch die Ionen bei der Aktivierung des Rezeptors fließen können [56]. Die Zusammensetzung dieser Untereinheiten variiert je nach

Rezeptortyp und Gewebe, was zu einer Vielzahl von nAChR-Subtypen mit unterschiedlichen pharmakologischen Eigenschaften führt [56,57]. Die Aktivierung der nAChRs durch ACh oder Nikotin führt zu einer schnellen Depolarisation der Zellmembran, was die Freisetzung von Neurotransmittern oder die Aktivierung nachgeschalteter Signalwege zur Folge haben kann [58]. Mecamylamin, ein nicht-selektiver und nicht-kompetitiver Antagonist der nAChRs, wirkt hemmend auf das parasympathische Nervensystem [54]. Auf molekularer Ebene regulieren nAChRs eine Vielzahl von physiologischen Prozessen, darunter Lernen, Gedächtnis und Schmerzverarbeitung [59]. Ihre Dysregulation ist mit verschiedenen pathologischen Zuständen wie der Nikotinabhängigkeit, neurodegenerativen Erkrankungen und bestimmten Formen von Krebs verbunden [56].

MACHRs sind eine Gruppe von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, die in fünf Subtypen (M1 bis M5) unterteilt sind und eine wesentliche Rolle in der Übertragung des parasympathischen Signals des Neurotransmitters ACh im Körper spielen [60]. Ihre Aktivierung beeinflusst eine Vielfalt von physiologischen Prozessen wie Herzfrequenz, Drüsensekretion und Muskelkontraktion [43]. Die M1, M3 und M5 Rezeptoren sind an der Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration beteiligt, während M2 und M4 die zelluläre Aktivität durch die Reduktion des cAMP-Spiegels dämpfen [60]. Die Dysregulation von mACHRs ist mit verschiedenen Krankheiten wie Alzheimer und COPD verbunden, was diese Rezeptoren zu wichtigen Zielen für medikamentöse Therapien macht [61,62]. Anticholinergika, die mACHRs blockieren, werden beispielsweise zur Entspannung der Atemwegsmuskulatur bei COPD eingesetzt [62]. Ein Beispiel für Anticholinergika ist Atropin, ein natürliches Tropan-Alkaloid und ein nicht-selektiver Muskarinrezeptor-Antagonist, der die Wirkung des parasympathischen Nervensystems unterdrückt, indem es ACh kompetitiv und reversibel von den Muskarinrezeptoren verdrängt [63].

Im nasalen Epithel des Menschen führt die Stimulation durch BC aufgrund ihrer parakrinen Wirkung zur Anregung der MC [3,40]. Dies ist ein lebenswichtiger Mechanismus, bei dem zilienträgende Zellen den produzierten Schleim nach außen transportieren, um Fremdkörper und Pathogene aus den Atemwegen zu entfernen [48,64]. Dies fördert die Selbstreinigung der Bronchien und der Trachea [65,66]. Der von den *Glandulae tracheales* produzierte Schleim, der eher dünnflüssig ist, überzieht die *Tunica mucosa* und schützt die Atemwege. Dieser ist ein wichtiger Bestandteil des Flüssigkeitsfilms, auch als "airway surface liquid" (ASL) bekannt [67] und dient der Befeuchtung und Reinigung der Atemwege [65,68]. Der Schleim hilft dabei, eingedrungene Partikel und Schadstoffe zu binden und aus den Atemwegen zu entfernen [69]. Die Bewegung des Schleims ist in Richtung des Rachens gerichtet und wird durch den

koordinierten Kinozilenschlag ausgeübt [64,70]. MC sorgt ebenso für eine kontinuierliche Erneuerung der Schleimschicht [71]. Während das Sekret in der Nase etwa alle 10 Minuten erneuert wird, kann der Transport des Schleims aus den tieferen Bereichen der Atemwege von Minuten bis zu mehreren Stunden dauern [72]. Diese schnelle Erneuerungsrate ist ein essentielles Schutzmerkmal der Schleimhäute der Atemwege und betont deren essentielle Bedeutung als Verteidigungs- und Reinigungssystem gegen mikrobielle Infektionen der Atemwege [72,73]. Es besteht ein direkter Zusammenhang zwischen Hustenepisoden und der MC [74]. Bei einer eingeschränkten MC kann der Hustenreflex teilweise kompensatorisch wirken und stellt somit einen wesentlichen sekundären Schutzmechanismus dar [75]. Daher liegt die Vermutung nahe, dass bei Krankheiten, die durch einen verstärkten Hustenreflex gekennzeichnet sind, die MC ihre Reinigungsfunktion nicht vollständig erfüllen kann. Allerdings ist dieser Kompensationsmechanismus lediglich bis zur fünften Generation der Bronchien effektiv [76]; darüber hinaus ist die Reinigung ausschließlich von der MC abhängig [76]. Diese Feststellung ist von besonderer Bedeutung, da es sich um den letzten Abschnitt handelt, durch den der Lufttransport vor dem eigentlichen Gasaustausch stattfindet [1].

2.3 Stickstoffmonoxid und seine Rolle bei Bitterstoffkaskade

NO ist ein vielseitiger Neurotransmitter, der sich von anderen Neurotransmittern durch seine gasförmige Beschaffenheit und seine Fähigkeit zur Diffusion über Zellmembranen hinweg unterscheidet [77]. Es wird in einer Vielzahl von Gewebetypen produziert, einschließlich Nervenzellen, Endothelzellen und Immunzellen. NO spielt eine zentrale Rolle bei der Regulation des Blutdrucks [78]. Im Nervensystem wirkt NO als ein wichtiger Botenstoff, der an der Neurotransmission, der Plastizität des Gehirns sowie an Lern- und Gedächtnisprozessen beteiligt ist [79]. Die Erzeugung von NO erfolgt durch Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS), von denen es mehrere Isoformen gibt [24,78]. Störungen im NO-Stoffwechsel sind mit verschiedenen pathophysiologischen Zuständen verbunden, darunter kardiovaskuläre Erkrankungen und neurodegenerative Störungen [77]. Durch Diffusion gelingt das NO schnell an seinen Bestimmungsort zu gelangen [80]. An diesem Wirkort stimuliert NO die zytosolische Guanylatzyklase, ein Enzym, welches die Umwandlung von Guanosintriphosphat (GTP) in zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) beschleunigt [68,81]. Das so gebildete cGMP setzt einen Signalkaskadenprozess in Gang, der letztendlich die Proteinkinase G aktiviert [81]. Diese wiederum fördert die Aktivität der Myosin-leichte-Ketten-Phosphatase, welche für die Dephosphorylierung des Myosins verantwortlich ist [77,80]. Dieser Prozess bewirkt eine Entspannung der glatten Muskulatur und damit eine Erweiterung der Blutgefäße, bekannt als

Vasodilatation [82]. In der menschlichen Trachea signalisiert NO die Präsenz potenziell schädlicher Stoffe, die zu einer Verlangsamung der Atmung und einer Steigerung sowohl des Hustenreflexes als auch der Gefäßdurchlässigkeit führt [14]. Separat davon kann eine Erweiterung der Bronchien auftreten [83].

Wie zuvor erwähnt, spielt NO in den menschlichen Atemwegen eine sehr wichtige Rolle und wird durch das respiratorische Epithel produziert [80]. Ob die Signalkaskade über die BC funktioniert, ist jedoch unklar. In den Atemwegen der Maus produziert das Epithel NO nicht [84], dadurch entfällt eine wichtige Übertragung von Erkenntnissen aus tierischen Modellen auf den Menschen. Dem heutigen Wissensstand zur Folge führt die Bitterrezeptor-Aktivierung im nasalen Flimmerepithel des Menschen zur Freisetzung des Neurotransmitters NO [24]. Diese Erkenntnisse lieferte erstmals Lee et al. im Jahr 2012. Sie kultivierten die respiratorischen Epithelzellen des Sinus des Menschen in Air-Liquid Interface Kulturen. Die untersuchten Epithelzellen wurden mit Phenylthiocarbamid (PTC, 100 μ M und 1 mM) stimuliert und in einem Zeitraum von zehn Minuten die Detektion von NO mittels DAF-FM-Fluoreszenz gemessen [22]. Nach der Zugabe von PTC in beiden Konzentrationen kam es zu einem signifikanten Anstieg des fluoreszierenden Indikators. Dieser Anstieg wurde durch das Blockieren von PLC(β 2) und durch den nicht-selektiven NO-Synthase-Hemmer L-NAME inhibiert.

In unserer Studie wurde die Bedeutung von NO bei der durch Bitterstoffe vermittelten Steigerung der MC untersucht. Dies wurde an einem explantierten respiratorischen Epithel der menschlichen Trachea getestet. Hierfür wurde ebenfalls vor der Bitterstoff-Gabe der NO-Synthase-Hemmer L-NAME (Enzo Life Sciences, Lörrach, Deutschland) zum Einsatz gebracht [85,86]. In dieser Arbeit wird die Hypothese untersucht, dass der Mechanismus der menschlichen MC-Steigerung durch Bürstenzellen nicht ausschließlich auf cholinergen Prozessen beruht, sondern ebenfalls durch NO-gesteuerte Vorgänge beeinflusst wird.

2.4 Zielsetzung der Arbeit

Die bisherigen Untersuchungen zu BC basieren hauptsächlich auf Tiermodellen oder humanen nasalen Flimmerepithelzellen, wodurch unsere Kenntnisse über ihre spezifische Verteilung und Rolle innerhalb der weiteren menschlichen Atemwege noch begrenzt sind. Dank der einzigartigen Ressourcen der Prosektur des anatomischen Instituts der Universität des Saarlandes in Homburg, die Zugang zu Körperspendern mit angemessenen *post mortem* Zeiten ermöglicht, eröffnete sich die Möglichkeit, die Mechanismen der MC in menschlichem Gewebe

in vitro zu untersuchen. Dabei war von besonderem Interesse, ob die bei murinen Modellen identifizierten Signalkaskaden auch im menschlichen Gewebe nachweisbar sind und inwieweit eine Beeinflussung der MC durch externe Stimuli, wie Bitterstoffe, möglich ist. Insbesondere wurde erforscht, ob neben den aus Mäusen nach BC-Stimulation mit Bitterstoffen bekannten cholinergen auch NO-regulierte Signalwege eine wesentliche Rolle in der Regulation der PTS der Zilien spielen, ähnlich den Mechanismen, die in der menschlichen Nasenschleimhaut beobachtet wurden [24].

Diese Forschungsarbeit verfolgt das Ziel, mehrere wesentliche Fragen zu klären:

- Ist es möglich, ein Modell der menschlichen Trachea zu etablieren, um das respiratorischen Epithel zu untersuchen?
- Kann eine postmortale Aktivität des respiratorischen Epithels im menschlichen Gewebe festgestellt werden? Wenn ja, in welchem *post mortem* Intervall?
- Wie genau gestaltet sich die Signalkaskade der BC in menschlichen Tracheen?
- Inwiefern beeinflussen Alter und Gesundheitszustand des Körperspenders die Funktion und die Effizienz der mukoziliären Clearance?
- Funktioniert die Geschmackstransduktionskaskade in Bürstenzellen beim Menschen ähnlich wie bei der Maus?
- Ist der TRPM5-Kanal für eine Aktivierung der MC essenziell?

3. Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Verwendete Stoffe

Die folgende Tabelle (s. Tabelle 3) gibt einen Überblick über alle Chemikalien und Stoffe, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Tabelle 3: Liste der verwendeten Stoffe.

<u>Chemikalien</u>	<u>Beschreibung</u>	<u>Hersteller</u>
Benötigte Stoffe bei den Partikeltransport-Versuchen		
ATP (dd)	Energieträger Agonist für purinerge Rezeptoren	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Acetylcholin (ACh)	Neurotransmitter, Agonist für ACh rezeptoren	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Atropin	Muskarinerge ACh- Rezeptor Antagonist	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Chinin-hydrochlorid Dihydrat (Quinine)	Bitter- u. Arzneistoff, Agonist für Bitterrezeptoren	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Chlorpheniramine maleate	Antihistaminikum, Bitterstoff, Agonist für Bitterrezeptoren	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Denatonium	Bitter- u. Arzneistoff, Agonist für Bitterrezeptoren	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Diphenidol hydrochloride	Antiemetika, Bitterstoff, Agonist für Bitterrezeptoren	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
MEM	Synthetisches Nährmedium	Life Technologies Limited, USA

DMSO	Organisches Lösungsmittel	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Dynabeads	Partikel	Invitrogen, Massachusetts, USA
Glutamin	Nicht-essentielle Aminosäuren (Nährstoffe)	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Germany
Ionomycin	Ca ²⁺ Ionophor	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Isofluran CP (1 ml/ml)	Inhalations-narkotikum	CP-Pharma, Burgdorf, Deutschland
L-Name	NO-Synthase-Inhibitor	Enzo Life Sciences, Lörrach, Deutschland
Mecamylamin	Nikotinerger ACh-Rezeptor Antagonist	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Penicillin-Streptomycin	Antibiotika	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Germany
Sylgard 184	Silikonelastomer	Dow Corning GmbH, Wiesbaden, Deutschland
Thapsigargin	Inhibitor der Ca ²⁺ -ATPase	Cayman Chemicals, Michigan, USA
Triphenylphosphine oxide	Organisches Lösungsmittel, Trpm5-Kanal Inhibitor	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Benötigte Stoffe bei der Schnitterstellung		
Rapid Bone Decalcifier	Kalklöser	Medline, Kleve, Deutschland
Pikrinsäure	Fixation von Gewebe	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Tissue Tek	Einbettmedium	Sakura, Umkirch, Deutschland
Flüssiger Stickstoff	Einbetten von Gewebe	Cryotherm, Kirchen, Deutschland
2-Methylbutan	Alkan mit hohem Gefrierpunkt	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Benötigte Stoffe bei der Methylenblaufärbung		
Methylenblau Lösung	Farbstoff	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Benötigte Stoffe bei der HE-Färbung		
Hämalaun	Farbstoff	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
0,1% Eosin	Farbstoff	Merck Millipore, Massachusetts, USA
Horse Serum	Bestandteil der Pufferlösung	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Tween	Tensid, Emulgator	Merck Millipore, Massachusetts, USA
Bovine Serum Albumin	Bestandteil der Pufferlösung	Biomol, Hamburg, Deutschland
Benötigte Stoffe bei der immunologischen Färbung		
Triton 0,3%	Permeabilisierung	Fluka, Buchs, Switzerland
PBS-Puffer (Phosphatgepufferte Salzlösung)	Pufferlösung	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
DAPI	Fluoreszenzfarbstoff der DNA markiert	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
4% Paraformaldehyd	Fixierung	Electron Microscopy Sciences, Hatfield, USA
Mowiol	Wasserlösliches Einschlussmittel	Sigma Aldrich, St. Louis, USA

3.1.2 Verwendete Geräte

Hier werden die Geräte aufgelistet, welche für die Durchführung der experimentellen Arbeiten dieser Studie genutzt wurden (s. Tabelle 4).

Tabelle 4: Liste der verwendeten Geräte.

Gerät	Hersteller
440-43N Waage	Kern Waagen, Balingen, Deutschland
Kreisschüttler OS-500	VWR International, Darmstadt, Deutschland
GFL Wasserbad 1002	GFL, Burgwedel, Deutschland
Kryostat Leica CM1950 Seriennummer 0666/03.2009	Leica, Bensheim, Deutschland
T5 -Environmental Culture Dish Controller	Bioprotechs, Butler, USA

CO2 Inkubator (MCO-5AX, UV)	Sanyo, Präfektur Ōsaka, Japan
Olympus BX 51 WI	Olympus GmbH, Hamburg, Deutschland
Eclipse 80i	Nikon, Minato, Japan
SMX-16E1M Kamera	Sumix, Oceanside, USA
Fluoreszenzmikroskop Axio	Zeiss, Jena, Deutschland
Olympus CHK Mikroskop	Olympus GmbH, Hamburg, Deutschland
Vakuumpumpe	KNF Neuberger, Trenton, USA

3.1.3 Verwendete Labormaterialien

In diesem Abschnitt findet man eine Zusammenfassung aller Labormaterialien, welche für die experimentellen Verfahren dieser Arbeit benötigt wurden (s. Tabelle 5).

Tabelle 5: Liste der verwendeten Labormaterialien.

<u>Material</u>	<u>Hersteller</u>
Exsikkator	Duran, DWK L.S., Wertheim, Deutschland
Pipetten und Pipettenspitzen	Brand GmbH, Wertheim, Deutschland
100x20 Glaspetrischale	Duran Group, Wertheim, Deutschland
50 ml Röhrchen	Greiner Bio One, Kremsmünster, Österreich
0,5 ml Mikroreaktionsgefäß	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Delta T Culture Dish 0,17 mm clear	Bioptechs, No. 04200417C, Butler, USA
Minutien Nadeln	Bioform, Nürnberg, Deutschland
Kryo-Einbettformen	Sakura, Umkirch, Deutschland
Filterpapier	Fisher Scientific, Hampton, USA
Parafilm	Amcor, Victoria, Australia
Glasobjektträger 75 x 25 x 1 mm	R.Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland

3.1.4 Lösungen und Puffer

In diesem Abschnitt werden die verschiedenen Lösungen und Puffer aufgeführt, welche für die experimentellen Verfahren dieser Studie verwendet wurden.

Histo-Block Lösung:

- 10 ml 10% Horse Serum, 0,5 ml 0,5% Tween, 0,1 g 0,1% BSA

Partikeltransport Puffer (PTP)

- 500ml ddH₂O, 0,209g *KCl* (5,6 mM), 3,985g *NaCl* (136mM), 0,98g Glucose (10,7mM), 1,19g Hepes (10mM), 0,1017g MgCl₂ (1mM), 0,1617 g CaCl₂ (2,2 mM).
In 500 ml H₂O lösen und pH auf 7,4 einstellen

Minimal Essential Medium

- 50 ml MEM, 500µl Penicillin, 500µl Glutamin

Zamboni Fixans

- 50 ml 37% Formaldehyd Lösung, 500 ml 0,2 M PP, 150 ml Pikrinsäure, 300 ml destilliertes Wasser

Phosphat Puffer (0,1 M, pH 7,4)

- 115 ml Lösung A, 385 ml Lösung B, 500 ml destilliertes Wasser

Lösung A

- 31,2 g NaH₂PO₄ x 2H₂O, 1 l destilliertes Wasser

Lösung B

- 35,6 g NaHPO₄ x 2H₂O, 1 l destilliertes Wasser

3.2 Untersuchung der PTS an murinen Gewebe

3.2.1 Mäuse

Die Messungen wurden an insgesamt 32 Mäusen des Stammes C57Bl/6J (Wildtyp) oder an physiologischen Wildtypen basierend auf diesem Stamm beider Geschlechter durchgeführt. Das durchschnittliche Alter lag zwischen 10 Wochen und 5 Monaten. Das durchschnittliche Körpergewicht der weiblichen Mäuse (n=19) betrug etwa 22 Gramm, während die männlichen Mäuse (n=13) im Durchschnitt etwa 2-3 Gramm schwerer waren. Die Gewichtsmessung wurde *post mortem* durchgeführt. Die Mäuse stammten aus eigener Zucht und wurden in einer Umgebung mit kontrollierter Raumtemperatur und Luftfeuchtigkeit untergebracht. Sie wurden einem regelmäßigen zwölfstündigen Tag-Nacht-Zyklus ausgesetzt und hatten ständigen Zugang zu Futter (Altromin, Lage) und Wasser. Die Unterbringung und alle durchgeführten Eingriffe erfolgten gemäß den Tierschutzvorschriften der Universität des Saarlandes (27. Juli 2017) sowie dem deutschen Tierschutzgesetz. Die Euthanasie der Tiere erfolgte mittels einer Überdosierung des Inhalationsanästhetikums Isofluran (CP-Pharma, Burgdorf, Deutschland), gefolgt von einer zervikalen Dislokation.

3.2.2 Versuchsvorbereitungen

Gemäß einem von uns etablierten Protokoll wurden zuerst alle für den Versuch benötigten Substanzen (s.u.) vorbereitet und bis zur Verwendung in einem 0,5 ml Mikroreaktionsgefäß auf Eis gelagert, um ein kontrolliertes Auftauen zu ermöglichen. Diese Substanzen wurden ausgewählt, um den Partikeltransport zu beeinflussen, der von den Zilien der zilientragenden Zellen in der Trachea der Wildtyp-Mäuse ausgeführt wird. Die ausgewählten Substanzen sind in der folgenden Tabelle (s. Tabelle 6) aufgelistet:

Tabelle 6: Liste der in den Versuchen verwendeten Stimuli und Inhibitoren.

Stimuli:
Chinin , ein Bitterstoff, der aus der Rinde des Cinchona-Baumes extrahiert wird, ist sowohl für seinen markanten, bitteren Geschmack [87] als auch für seine historische Rolle in der Malariabehandlung bekannt [88]. Diese Substanz, die in der Medizingeschichte tief verwurzelt ist, behält ihre Bedeutung in der zeitgenössischen wissenschaftlichen Forschung, insbesondere in Studien zu Bittergeschmacksrezeptoren im menschlichen Organismus. Chinin zählt zu den Verbindungen, die Bitterrezeptoren aktivieren und wurde daher in der Erforschung der menschlichen Geschmackswahrnehmung eingesetzt [27].

Chlorpheniramin, ein Antihistaminikum, wird hauptsächlich zur Behandlung von Allergiesymptomen verwendet [89]. Es gibt jedoch auch Hinweise darauf, dass Chlorpheniramin die Wahrnehmung von Bittergeschmack beeinflussen kann [90]. Das Ziel dieses Experiments war, ähnlich wie bei der Untersuchung von Diphenidol, die Auswirkungen von Chlorpheniramin auf die Signalübertragungskaskade der Bitterrezeptoren zu untersuchen.

Denatonium, auch bekannt unter den Handelsnamen Bitrex oder Aversion, ist eine chemische Verbindung, die zu den extrem bitteren Substanzen zählt und der Gruppe der quaternären Ammoniumverbindungen angehört [91]. Diese Substanz wird aufgrund ihrer ausgeprägten Bitterkeit als der bitterste bekannte Stoff angesehen und erfordert nur winzige Mengen, um in großen Verdünnungen einen intensiven, unangenehmen Geschmack zu erzeugen [92]. Bitterstoffe wie Denatonium aktivieren bestimmte Geschmacksrezeptorzellen und chemosensorische Zellen, welche durch die Präsenz von Rezeptoren der TAS2R-Familie charakterisiert sind [30].

Diphenidol ist eine chemische Verbindung, die primär als Antiemetikum eingesetzt wird, um Übelkeit und Erbrechen zu therapieren [93]. Neben seiner Hauptfunktion beeinflusst Diphenidol auch Bitterrezeptoren und hat die Fähigkeit, die Wahrnehmung von bitterem Geschmack zu modulieren [94].

Ionomycin, eine von *Streptomyces globatus* produzierte chemische Verbindung [95], dient als Calcium-Ionophor [96]. Das bedeutet, es kann selektiv Calcium-Ionen durch Zellmembranen transportieren. Es beeinflusst die intrazelluläre Produktion von Zytokinen wie Interferon, Interleukin-2 und Interleukin-4, was zu einem raschen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration und anschließendem Zelltod führt [97]. Aufgrund seiner Fähigkeit, den Calciumtransport in Zellen zu steuern, ist Ionomycin ein wichtiges Werkzeug in Experimenten, die die Manipulation der intrazellulären Calciumkonzentration zum Ziel haben [97].

Thapsigargin ist eine pflanzliche Verbindung, die vor allem in der Gattung Thapsia vorkommt [98]. Dieses Molekül inhibiert spezifisch die Calcium-ATPase in den Membranen des endoplasmatischen Retikulums sowie des Golgi-Apparats, was zu einer Erhöhung der intrazellulären Calciumspeicher führt [99]. Diese Zunahme hat vielfältige Auswirkungen auf zelluläre Prozesse und ermöglicht die Untersuchung von calciumabhängigen Signalwegen, ähnlich der Wirkung von Ionomycin.

ATP, ist ein Nukleotid, dass spezifisch mit den P2Y2- sowie den P2X-Rezeptoren interagiert, insbesondere mit den Untereinheiten P2X4 und P2X7, die als spezielle Ionenkanäle im zilienträgenden Epithel der Atemwege fungieren [44,100,101,102]. Diese Interaktion bewirkt einen Calciumeinstrom, der bei längerer ATP-Exposition eine dauerhafte Aktivierung der zilienträgenden Zellen auslöst.

Inhibitoren:

Atropin ist ein natürliches Tropan-Alkaloid und ein nicht-selektiver Muskarinrezeptor-Antagonist, das die Wirkung des parasympathischen Nervensystems unterdrückt, indem es ACh kompetitiv und reversibel von den Muskarinrezeptoren verdrängt [63].

Mecamylamin, ein nicht-selektiver und nicht-kompetitiver Antagonist der nAChRs, wirkt hemmend auf das parasympathische Nervensystem [54].

TPPO (Triphenylphosphanoxid) gilt als einer der potentesten selektiven Inhibitoren des Ca^{2+} -gesteuerten TRPM5-Kanals sowohl beim Menschen als auch bei Mäusen [32, 103]. TRPM5-Kanäle sind in einer Vielzahl von Gewebetypen präsent und spielen eine wesentliche Rolle in der Signalübertragung sowie als Sensoren für verschiedene Geschmacksstoffe [104]. Der Einsatz von TPPO ermöglicht eine gezielte Beeinflussung der Funktionsweise von TRPM5-Kanälen [103].

L-Name ist ein nicht-selektiver NO-Synthase-Hemmer [85].

Die Stimuli und Inhibitoren wurden in folgender Konzentration angewendet (s. Tabelle 7):

Tabelle 7: Liste der verwendeten Stimuli und Inhibitoren mit den jeweiligen Konzentrationen.

	Stocklösung:	Gelöst in:	Endkonzentration:
Stimuli:			
Chinin	10 mM	1,5 ml PTP	100 μM
Chlorpheniramin	30 mM	1,5 ml PTP	300 μM
Denatonium	100 mM	1,5 ml PTP	1 mM
Diphenidol	20 mM	1,5 ml PTP	200 μM
Ionomycin	1 mM	1,5 ml PTP	10 μM
Thapsigargin	1 mM	1,5 ml PTP	10 μM
ATP	10 mM	1,5 ml PTP	100 μM
Inhibitoren:			
Atropin	5 mM	1,5 ml PTP	50 μM
Mecamylamin	10 mM	1,5 ml PTP	100 μM
TPPO	10 mM	1,5 ml PTP	100 μM
L-Name	2 mM	1,5 ml PTP	20 μM

Der Partikeltransportpuffer wurde in ein 50-ml-Röhrchen (Greiner Bio-One) umgefüllt und in einem Wasserbad (GFL 1002) auf 32°C erwärmt, um die physiologischen Bedingungen für das exzidierte Epithel nachzuahmen. Anschließend wurden 750 μl des erwärmten PTPs in ein Delta

T Kulturschälchen (0,17 mm klar, Bioptechs, Art.-Nr. 04200417C, USA), im weiteren Verlauf nur als Kulturschälchen (s. Abb. 1) bezeichnet, gegeben und auf dem Mikroskop unter einem 20x/0.50, DIC M/N2 Objektiv (∞ 0.17, WD 2.1) positioniert.



Abbildung 1: Kulturschälchen mit aufgespanntem murinem Trachealgewebe in 1,5 ml PTP.

Die Temperatur in den Kulturschälchen wurde mithilfe des Delta T5 μ -Environmental Culture Dish Controllers (Bioptechs, s. Abb. 2) konstant bei 32°C gehalten, wobei ein Temperaturfühler zur Überwachung eingesetzt wurde. Um eine stabile Befestigung des Gewebes zu ermöglichen, wurden alle Kulturschälchen im Vorfeld mit einer dünnen Schicht Sylgard 184¹ (Dow Corning GmbH) beschichtet.

Zusätzlich wurden vor Beginn der Organentnahme die Pipetten (Brand GmbH, Wertheim, Deutschland) und Timer vorbereitet, um während der Messung der PTS einen reibungslosen Ablauf zu gewährleisten. Das im Voraus erstellte Protokoll wurde entsprechend den Forschungszielen ausgefüllt und für den Einsatz bereitgestellt. Zudem wurde das Programm Stream Pix (NorPix Inc., Montreal, Kanada) konfiguriert, mit Einstellungen für die Bildgröße (X 640, Y 512), eine Expositionszeit von 6ms, eine Bildrate von 12 Hz und eine Decimation von 1:1, um eine optimale Datenerfassung zu ermöglichen.

¹ Sylgard 184 (Dow Corning GmbH, Wiesbaden, Deutschland) ist ein klares Silikon-Elastomer. Hergestellt wurde dieser aus der Sylgard 184 Base und Sylgard 184 Härter im Verhältnis 9:1. Folgend wurde es mindestens für zwei Stunden bei Raumtemperatur unter dem Abzug verrührt. Um beim Rührvorgang entstandene Luftblasen mittels Vakuum zu entfernen, wurde das Gemisch für 2 Std. in einem Exsikkator positioniert. Nach der Reinigung der Oberfläche des Delta T Kulturschälchens mit 70 % Ethanol wurden mittig 1,2 ml - 1,5 ml des hergestellten Gels aufgetragen und zur Auspolymerisierung bei 60°C über Nacht in den Wärmeschrank gestellt.

3.2.3 Organentnahme

Die Präparation begann mit einem medianen Schnitt von der unteren Bauchregion bis zum Kehlkopf, um Abdomen und Thorax zu öffnen. Anschließend wurde die Vena cava inferior in der unteren Bauchregion durchtrennt. Nach der Durchtrennung wurde die Trachea von den angrenzenden Gewebestrukturen befreit, isoliert und in einem Kulturschälchen mit 1,5 ml PTP bei 32°C fixiert. Die Fixierung des Trachealgewebes erfolgte mithilfe von zwei Minutiennadeln (Bioform, Nürnberg, Deutschland), die es unter leichter Spannung an beiden Enden im Sylgard 184 sicherten. Unter einem Mikroskop (Olympus BX 51 WI, Olympus GmbH) wurde die Trachea sorgfältig von umliegenden Strukturen befreit und entlang des *Musculus trachealis* längs aufgeschnitten. Das präparierte Gewebe wurde dann in zwei Hälften geteilt, die jeweils in einem Kulturschälchen mit 750 µl PTP und einem weiteren mit 1,5 ml MEM (Minimal Essential Medium, Gibco) durch vier Minutiennadeln aufgespannt wurden. Für diesen Vorgang standen mir 30 Minuten zur Verfügung. Nach Ablauf dieser Zeit begann die eigentliche Messung.

Die Aufteilung des Gewebes erlaubte es, zwei separate Messungen vorzunehmen, um die Trachea optimal zu nutzen. Das MEM diente der Aufrechterhaltung der Vitalität des Gewebes durch Bereitstellung notwendiger Nährstoffe. Das zweite Kulturschälchen wurde anschließend in einen Brutschrank (CO₂-Inkubator, Sanyo, Japan) überführt, um physiologische Bedingungen zu simulieren.

3.2.4 Messung des Partikeltransports

Das Kulturschälchen mit der fixierten Trachea und 750 µl PTP wurde unter dem Mikroskop Eclipse 80i (Nikon, Japan; s. Abb. 2) positioniert. Um das Risiko eines Überlaufens des Puffers zu minimieren, wurden weitere 750 µl PTP erst nach der Positionierung des Kulturschälchens eingefüllt. Unter Verwendung eines spezifischen Objektivs wurde ein Bereich zwischen den Knorpelringen fokussiert, um einen optimalen Kontrast zwischen den Partikeln und dem Hintergrund zu erzielen. Nach Überprüfung der Temperatur wurden 3 µl einer 30 mg/ml Dynabeads-Lösung (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) hinzugefügt, die als Partikel (Durchmesser: 2,8 µm) fungieren, welche von den Zilien in variierender Geschwindigkeit transportiert werden. Das Gemisch wurde sorgfältig mit einer Pipette durchmischt und auf eine Fokusebene eingestellt, die einen optimalen Abstand zu den Zilien aufweist, um die Bewegung der Partikel präzise zu beobachten.



Abbildung 2: Mikroskop- und Temperaturüberwachungssystem. A: T5 Environmental Culture Dish Controller eingestellt auf 32°C. Mikroskop. B: Eclipse 80i (Nikon, Japan).

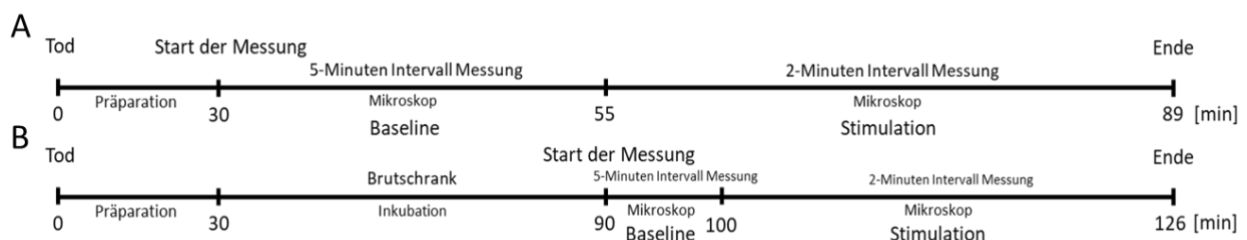


Abbildung 3: Graphische Darstellung des allgemeinen Protokolls für das erste (A) und zweite (B) murine Trachealgewebe (Stimulations- und Inhibitionsversuche). A: Nach der Durchtrennung der *Vena cava inferior* (Minute 0) erfolgte die Präparation des murinen Trachealgewebes. Ab der 30. Minute wurden in 5-minütigen Intervallen Aufnahmen erstellt, bis zur Minute 55 (Baseline). Ab der 55. Minute erfolgten die Aufnahmen in zweiminütigen Intervallen zur Erfassung der Stimulationsphase bis zu der letzten Aufnahme in der 89. Minute. B: Das zweite murine Trachealgewebe wurde nach der Präparation zur Inkubation in einen Brutschrank gelegt. Nach Abschluss des ersten Versuchs (A) begann man in der 90. Minute mit der ersten Aufnahme und maß eine zehnmünütige Baseline. Ab der 100. Minute wurden in zweiminütigen Intervallen Aufnahmen gemacht, um die Stimulationsversuche zu dokumentieren. Die letzte Aufnahme erfolgte in der 126. Minute.

Die Experimente starteten 30 Minuten nach der Durchtrennung der *Vena cava inferior* (s. Abb. 3). Mittels einer angeschlossenen Kamera (SMX-16E1M, Sumix Corporation) wurden über die Software Stream Pix kurze Videoaufnahmen aufgenommen und zur weiteren Analyse digital gespeichert. Die ersten 25 Minuten zielten darauf ab, die Basisgeschwindigkeit des Partikeltransports ohne Substanzzugabe zu erfassen (Baseline), indem alle fünf Minuten Aufnahmen gemacht wurden. Anschließend wurden in zweiminütigen Intervallen weitere Videoaufzeichnungen durchgeführt. Falls Inhibitoren zugefügt worden sind, erfolgte dies in der 56. Minute (s. Abb. 4B), ansonsten wurde zum gleichen Zeitpunkt 15 µl PP hinzugefügt (Vehikel, s. Abb. 4A). In der 60. Minute erfolgte die Zugabe eines Stimulus, um die Effekte auf die Transportgeschwindigkeit zu untersuchen. In der 74. Minute wurde ATP hinzugefügt, um die Funktionalität des Gewebes nachzuweisen. Es wurden jeweils 15 µl der ausgewählten Substanzen verwendet und im

Kulturschälchen vermischt, um eine gleichmäßige Verteilung zu sichern. Zwischen den Zugaben, in Phasen ohne weitere Substanzgabe, erfolgte ebenfalls ein gründliches Mischen im Kulturschälchen. Dies gewährleistete eine effektive Verteilung der Stoffe und verhinderte das Absinken der Dynabeads (Invitrogen, Massachusetts, USA).

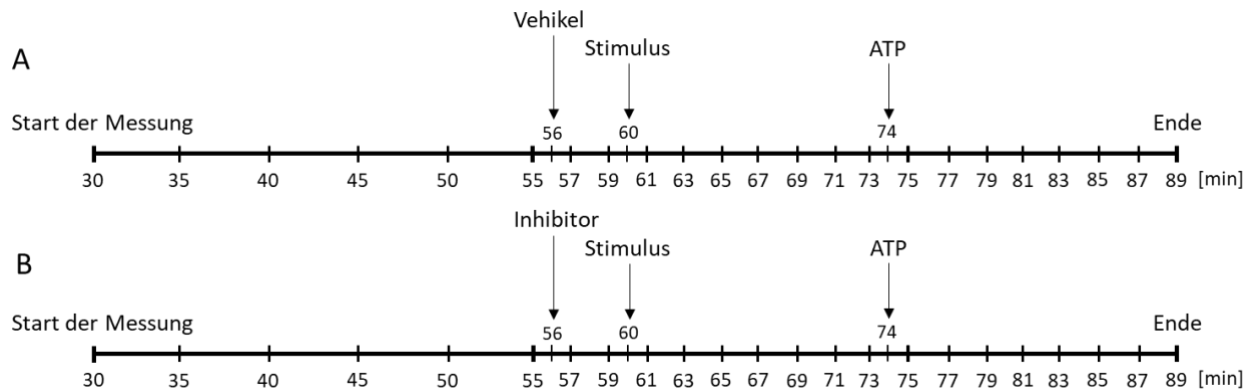


Abbildung 4: Graphische Darstellung des konkreten Protokolls für das erste murine Trachealgewebe. A: Standardprotokoll für Stimulationsversuche: Die Experimente begannen mit einer 30-minütigen Präparation, gefolgt von der Aufnahme kurzer Videos im 5-Minuten-Intervall bis zur 55. Minute. Danach wurden die Videos in 2-Minuten-Intervallen aufgenommen. Bei Minute 56 erfolgte eine Zugabe des Vehikels (Trägersubstanz). Der Stimulus wurde bei Minute 60 hinzugefügt, und ATP wurde in der 74. Minute zugegeben. B: Standardprotokoll für die Inhibitionsversuche: In der 56. Minute erfolgte die Zugabe des Inhibitors. Vier Minuten später, in der 60. Minute, erfolgte die Zugabe des Stimulus. ATP wurde ebenfalls in der 74. Minute hinzugefügt. Die letzte Videoaufnahme wurde in der 89. Minute erstellt.

Für den anschließenden Versuch wurde die zweite Hälfte der Trachea verwendet und nach einem ähnlichen Protokoll vorbereitet (s. Abb. 5). Nach dem Aufspannen im neuen Kulturschälchen, gefüllt mit 750 μ l PTP, wurde dieses zunächst unter das Mikroskop positioniert und weitere 750 μ l PTP hinzugefügt. Wie bereits zuvor beschrieben, wurde ein Bereich zwischen den Knorpelringen fokussiert. Anschließend erfolgte die Überprüfung der Temperatur und die Zugabe von 3 μ l einer 30 mg/ml Dynabeads-Lösung. Mit der ersten Aufnahme begann die Messung. Dadurch, dass sich die zweite Probe zirka 60 Minuten in einem Inkubator befand, hatten die Zellen genug Zeit, um ihre Ruhefrequenz einzustellen und somit wurde die Baseline auf zehn Minuten festgelegt. In diesem Zeitraum wurden drei Videoaufnahmen gemacht: zu Beginn, nach fünf Minuten und nach zehn Minuten. Ab der zehnten Minute wurden regelmäßige Aufnahmen im Zweiminutenintervall erstellt. Falls ein Inhibitor gegeben wurde, erfolgte dies in der 11. Minute. Die Zugabe des Stimulus fand in der 15. Minute statt und ATP wurde in der 31. Minute hinzugefügt. Die letzte Aufnahme erfolgte in der 36. Minute.

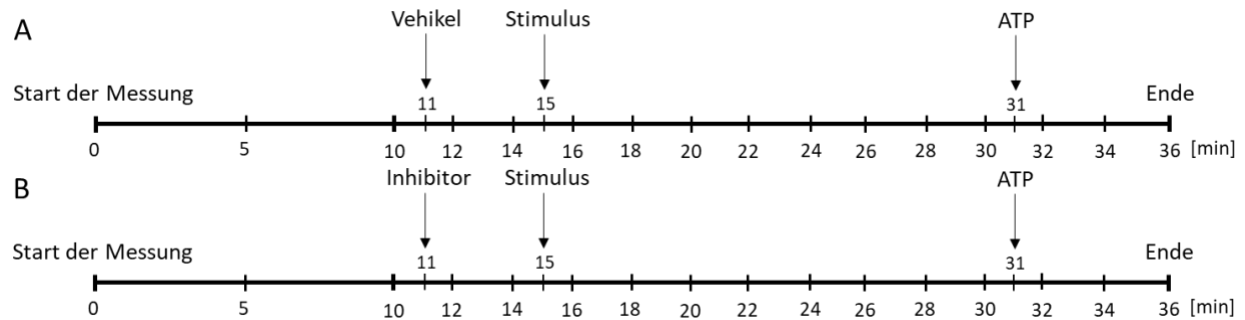


Abbildung 5: Graphische Darstellung des konkreten Protokolls für das zweite murine Trachealgewebe. Die Minute 90 ist in der Abb. 3B als Minute 0 dargestellt. A: Standardprotokoll für Stimulationsversuche: Aufgrund der längeren *post mortem* Zeit wurde eine Baseline von zehn Minuten festgestellt, in der kurze Videos mit einem 5-Minuten-Intervall aufgenommen wurden. Ab der 10. Minute wurden Aufnahmen im 2-Minuten-Intervallen aufgenommen. Bei Minute 11 erfolgte eine Zugabe des Vehikels (Trägersubstanz). Der Stimulus wurde bei Minute 15 hinzugefügt, und ATP wurde in der 31. Minute zugegeben. B: Standardprotokoll für die Inhibitionsversuche: Die Zugabe von dem Inhibitor erfolgte in der 11. Minute. Vier Minuten später, in der 15. Minute, erfolgte die Zugabe des Stimulus. ATP wurde ebenfalls in der 31. Minute hinzugefügt. Die letzte Videoaufnahme wurde in der 36. Minute erstellt.

3.3 Untersuchung der PTS an humanen Gewebe

3.3.1 Körperspender

Das in dieser Studie untersuchte Trachealgewebe wurde von insgesamt 14 Körperspendern des Anatomischen Instituts der Universität des Saarlandes bezogen (Bezeichnung der Körperspender: 20/80, 20/84, 20/85, 20/92, 21/08, 21/16, 21/21, 21/22, 21/31, 21/34, 21/36, 21/39, 21/40, 21/42). Die Auswahl der Spender umfasste Personen beider Geschlechter (♀ n=6, ♂ n=8) im höheren Alter, welche zwischen 68 und 85 Jahren alt waren und zu Lebzeiten ihren Körper der wissenschaftlichen Forschung zur Verfügung gestellt hatten. Die Vorgeschichte der Spender bezüglich früherer Erkrankungen, Schadstoffbelastungen und allgemeinen Lebensbedingungen war mir nicht bekannt. Das *post mortem* Intervall, also die Zeitspanne zwischen dem Versterben der Spender und der Entnahme des Gewebes, betrug in der Regel zwischen 8 und 20 Stunden. Um das Risiko einer Kontamination und Verfälschung der Ergebnisse zu minimieren, wurden mir Gewebeproben von Spendern, die an infektiösen Krankheiten oder Atemwegserkrankungen litten, nicht zur Verfügung gestellt. Trotz dieser Vorsichtsmaßnahmen konnte das Vorliegen anderer, für diese Studie relevanter Erkrankungen bei den Spendern nicht mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden. Genehmigung durch die Ethikkommission und Einwilligung zur Teilnahme: Die Studie erhielt unter den Nummern 200/20 und 293/21 die Genehmigung der zuständigen Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes in Saarbrücken, Deutschland.

3.3.2 Versuchsvorbereitung

Vor Beginn der Versuche wurde frisches MEM angesetzt und in einem Wasserbad auf optimale Temperatur vorgewärmt. Ziel war es, dem entnommenen Gewebe bestmögliche physiologische Bedingungen für die nachfolgenden Experimente zu bieten. Nach Eintreffen des Körperspenders wurde umgehend mit der Entnahme der Trachea begonnen, um die *post mortem* Zeit möglichst gering zu halten und die Gewebefunktionalität weitestgehend zu erhalten.

Die benötigten Substanzen wurden im Voraus vorbereitet (s. Tabelle 6 und 7) und ebenso bis zur Verwendung in einem 0,5 ml Mikroreaktionsgefäß auf Eis gelagert.

3.3.3 Trachea Exzision und Epithelvorbereitung

Die Extraktion der Trachea begann mit der Palpation des Ringknorpels, um den idealen Ausgangspunkt für die Inzision zu bestimmen. Ein medialer Schnitt wurde dann unterhalb des Ringknorpels angesetzt und entlang der Medianlinie bis zum Beginn des Sternums fortgeführt. Dieser Schritt erforderte unter anderem eine gute Koordination mit der Assistenz, die mithilfe von zwei Langenbeck-Reraktoren die Wunde auseinanderhielt. Diese Maßnahme war essenziell, um einen ungehinderten Zugang zu den tief liegenden Strukturen zu gewährleisten und gleichzeitig die Integrität des Gewebes zu bewahren. Während der Präparation wurde besondere Sorgfalt darauf verwendet, die Trachea von umliegenden Geweben und Strukturen zu isolieren.

Nach der erfolgreichen Freilegung wurde die Trachea entnommen. Dabei wurde darauf geachtet, benachbarte Strukturen wie die großen Blutgefäße, den Ösophagus und die Nervenbahnen nicht zu beschädigen. Die entnommene Trachea, typischerweise ein Segment von 4-6 cm Länge, wurde zur weiteren Verarbeitung in einem 50 ml Falcon-Röhrchen, gefüllt mit MEM, gelagert. Dieses Medium diente dazu, eine Degradation des Gewebes bis zur weiteren Verarbeitung zu verhindern.

Der nächste Schritt umfasste die Trennung des Epithels vom restlichen Trachealgewebe. Besondere Aufmerksamkeit wurde darauf gelegt, das Epithel nicht aus dem *Paries membranaceus* zu entnehmen, da dieser Bereich unseren Erfahrungen nach eine niedrigere Dichte an BC aufweist und somit für die spezifischen Untersuchungsziele weniger relevant war. Die Präparation fand in einer mit 20 ml MEM gefüllten 100 x 20 Glaspetrischale (Duran Group, Wertheim, Deutschland) statt. Erst wurde die Trachea durch horizontale Schnitte in mehrere Streifen geteilt (bis zu zwei Knorpelringe pro Streifen), was zu einer erleichterten Entnahme des Epithels führte. Eine Assistenz war auch hier unerlässlich, um die Streifen während der

Präparation stabil zu halten und eine effektive Aufspannung für die Trennung des Epithels zu gewährleisten. Abschließend wurde das Epithel mit einer Pinzette angehoben und mithilfe eines Skalpells von den darunterliegenden Strukturen separiert. Die erfolgreich isolierten Epithelstücke wurden in einem Kulturschälchen fixiert, das ausreichend mit MEM gefüllt und anschließend im Brutschrank inkubiert wurde. Dies ermöglichte es, zunächst die zuerst entnommene Probe zu analysieren, gefolgt von den nachfolgenden Proben.

Um die BC mittels einer geeigneten Färbung sichtbar zu machen, wurden bis zu zwei Knorpelspangen belassen (s. Abb. 6).

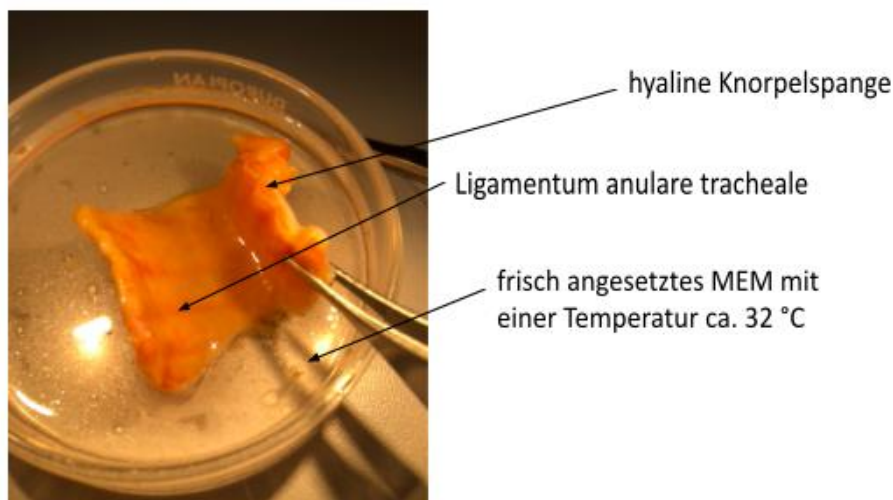


Abbildung 6: Frisch entnommene menschliche Trachea nach dem Entfernen der *Parietalmembran*.

3.3.4 Messung des Partikeltransports

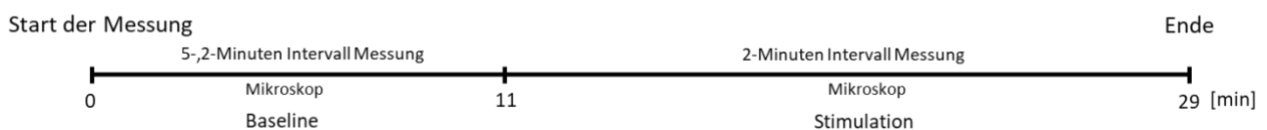


Abbildung 7: Graphische Darstellung des allgemeinen Protokolls für das humane Gewebe. Nach der Entnahme des Trachealepithels wurde zunächst eine 11-minütige Baseline gemessen. Während dieser wurden Aufnahme sowohl in fünfminütigen als auch in zweiminütigen Abständen erstellt. Ab der 12. Minute wurde ausschließlich in zweiminütigen Intervallen fortgeführt (Stimulationsphase). Die letzte Aufnahme erfolgte in der 29. Minute.

Die Messungen des Partikeltransports wurden gemäß dem Protokoll für Mausversuche durchgeführt, jedoch mit angepassten Zeitintervallen (s. Abb. 7). Bei Menschen wurde aufgrund

der bereits längeren *post mortem* Zeitspanne stets das gleiche Protokoll angewendet, im Gegensatz zu den Mausversuchen. Die Baseline-Phase dauerte 11 Minuten, mit Aufnahmen zu Beginn sowie in der 5., 7. und 9. Minute. Weitere Aufnahmen erfolgten im Zwei-Minuten-Intervall. Zu Versuchsbeginn, in der 12. Minute, wurden 15 μ l Pufferlösung (Vehikel) zugegeben, um Mischungsfehler auszuschließen, ohne eine Reaktion zu erwarten. Falls ein Inhibitor verwendet wurde, erfolgte dessen Zugabe in der 12. Minute. In der 16. Minute wurde ein Stimulus hinzugefügt. Abschließend wurde in der 24. Minute ATP zugegeben, um die Funktionsfähigkeit des Gewebes zu überprüfen. Die letzte Aufnahme wurde in der 29. Minute gemacht (s. Abb. 8).

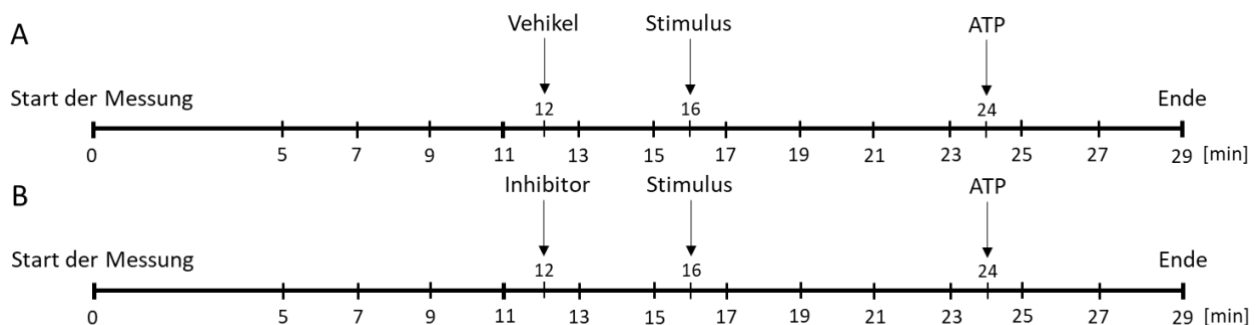


Abbildung 8: Graphische Darstellung des konkreten Protokolls für das humane Trachealgewebe. A: Standardprotokoll für Stimulationsversuche: Aufgrund der längeren *post mortem* Zeit wurde eine Baseline von 11 Minuten festgelegt. In dieser Zeit wurden Videoaufnahmen zu Beginn sowie nach 5, 7, 9 und 11 Minuten gemacht. Ab der 11. Minute erfolgten die Aufnahmen nur noch in 2-Minuten-Intervallen. Die Zugabe von Vehikel fand in der 12. Minute statt. Der Stimulus wurde in der 16. Minute hinzugefügt, und ATP wurde in der 24. Minute zugegeben. B: Standardprotokoll für die Inhibitionsversuche: Die Zugabe des Inhibitors erfolgte in der 12. Minute. Vier Minuten später, in der 16. Minute, wurde der Stimulus hinzugefügt. ATP wurde ebenfalls in der 24. Minute zugegeben. Die letzte Videoaufnahme erfolgte in der 29. Minute.

3.4 Statistische Methoden und Datenanalyse

Alle Aufnahmen wurden mithilfe des Programms Stream Pix erstellt. Anschließend wurden die Videodateien zur Analyse in das Programm Image-Pro Premier (Media Cybernetics, Rockville, USA) importiert. Die Funktionsweise dieses Programms beruht auf der selbständigen Erkennung der Partikel durch die Kontrastunterschiede. Basierend auf der erfassten Distanz, die die Partikel über einen definierten Zeitraum zurücklegen, berechnet das Programm die Geschwindigkeit jedes einzelnen Partikels in Mikrometern pro Sekunde ($\mu\text{m/s}$). Die so ermittelten Geschwindigkeitswerte werden dann in eine Excel-Tabelle exportiert. Mithilfe der Mittelwertfunktion in Excel wird die durchschnittliche Geschwindigkeit aller Partikel für definierte Zeitpunkte berechnet. Dieser Prozess wurde für jede Videoaufnahme in regelmäßigen Zeitabständen wiederholt. Abschließend wurde auf Basis der gesammelten Daten ein Diagramm erstellt, welches den dynamischen Verlauf des Experiments visualisiert.

Für die Analyse der erhobenen Daten wurde das GraphPad Prism Version 9 verwendet, ein Statistik- und Grafiksoftwareprogramm, das speziell für wissenschaftliche Zwecke entwickelt wurde. Es unterstützt eine umfangreiche Analyse biologischer Daten und bietet vielfältige Funktionen für die Erstellung von Grafiken und die Durchführung statistischer Tests [105]. Für die Auswertung der Daten wurde der Student's t-Test genutzt. Dieser dient dem Vergleich der Mittelwerte zweier Gruppen, um festzustellen, ob sich diese signifikant voneinander unterscheiden. Der Test berücksichtigt dabei die Varianzen innerhalb der Gruppen und die Gruppengrößen. Er ist besonders nützlich, um die Wirksamkeit von Behandlungen oder Unterschiede in experimentellen und Kontrollgruppen zu bewerten.

Zunächst wurden die Ergebnisse den entsprechenden Experimenten zugeordnet. Anschließend wurden die Werte der PTS vor und nach der Verabreichung der Substanz in das System eingetragen. Dies ermöglichte es, die Veränderungen der Geschwindigkeit zu analysieren und zu interpretieren. Die Annahme der Normalverteilung der Daten erlaubt dem Student's t-Test, eine Beurteilung vorzunehmen, die Aufschluss darüber gibt, wie wahrscheinlich es ist, dass die beobachteten Unterschiede nicht auf Zufall beruhen.

Mit Hilfe von GraphPad Prism wurden anschließend die Grafiken für den Ergebnisteil dieser Arbeit erstellt. Zudem wurde der p-Wert berechnet, welcher die statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen den Gruppen angibt und somit die Interpretation der experimentellen Daten ermöglicht. Das Signifikanzniveau des p-Werts wird in den Graphen durch die Symbole "ns" (nicht signifikant), *, **, *** und **** dargestellt. Diese können wie folgt interpretiert werden:

- ns: $p > 0,05$
- *: $p \leq 0,05$
- **: $p \leq 0,01$
- ***: $p \leq 0,001$
- ****: $p \leq 0,0001$

Diese Kodierung ermöglicht eine schnelle visuelle Einschätzung der statistischen Signifikanz der Unterschiede zwischen den verglichenen Gruppen. Ein niedriger p-Wert erhöht die Sicherheit, dass der festgestellte Effekt real und nicht zufällig ist [106].

3.5 Histologische Darstellung der Trachea

3.5.1 Herstellung der Präparate

Humane Trachea:

Ein intakter Knorpelring wurde mithilfe von Zamboni-Fixans über einen Zeitraum von fünf Stunden fixiert, um die Proteinstruktur zu konservieren. Die Fixierung fand auf einem Kreisschüttler OS-500 (VWR International, Darmstadt, Deutschland) statt, um eine gleichmäßige Fixierung sicherzustellen und Ablagerungen vorzubeugen. Nach der Fixierung wurde das Gewebe gründlich mit 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,4) gespült, wobei die Spülflüssigkeit in den 50 ml Falcons mehrfach gewechselt wurde, bis keine Verfärbung mehr erkennbar war.

Für die Entkalkung wurden die Knorpelspannen am darauffolgenden Tag in 100 ml Rapid Bone Decalcifier (Medline, Kleve, Deutschland) für fünf bis sechs Stunden eingelegt. Dies erfolgte ebenfalls auf dem Kreisschüttler, was eine effektive Entkalkung sicherstellte und die physikalischen Eigenschaften des Knorpels für das Schneiden optimierte. Der Einsatz von Rapid Bone Decalcifier (RPB) erleichterte das spätere Schneiden des Gewebes am Kryostaten erheblich, indem er die Härte und Festigkeit des Knorpels reduzierte. Nach der Entkalkung wurde das Gewebe erneut mit 0,1 M Phosphatpuffer ausgiebig gewaschen, bis sämtliche Reste des Decalcifiers entfernt waren, um eine optimale Vorbereitung für die Einbettung zu gewährleisten. Das vorbereitete, entkalkte Gewebe wurde anschließend eingefroren. Für die Einbettung kam Tissue-Tek (Sakura, Umkirch, Deutschland) zum Einsatz, wobei das Gewebe in speziellen Kryoeinbettformen (Sakura, Umkirch, Deutschland) platziert wurde. Um eine schnelle und gleichmäßige Gefrierung zu erreichen, wurde das Gewebe in einen Behälter mit 2-Methylbutan (Roth, Karlsruhe, Deutschland) getaucht, der in flüssigem Stickstoff (Cryotherm, Kirchen, Deutschland) gekühlt wurde. Anschließend wurde das Gewebe mit beschriftetem Filterpapier (Fisher Scientific, Hampton, USA) markiert und mit Tissue-Tek fixiert, gefolgt von einer weiteren Eintauchung in 2-Methylbutan. Um Kontamination zu vermeiden und die Lagerungsbedingungen zu optimieren, wurde das Gewebe mit Parafilm (Amcors, Victoria, Australia) umwickelt und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Der komplette Vorgang wurde stets dokumentiert.

Die Präparate wurden anschließend im Kryostaten (Leica, Bensheim, Deutschland) zu 10 µm dünnen Schnitten verarbeitet, die auf Glasobjektträgern (75 x 25 x 1,0 mm, R.Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland) platziert und bei -20°C aufbewahrt wurden. Diese niedrige Lagerungstemperatur war wichtig, um die Qualität der Schnitte bis zur weiteren Analyse zu erhalten.

3.5.2 Färbung der Präparate

Methylenblau-Färbung

Die Methylenblau-Färbung wurde angewandt, um die Präsenz und Integrität des Epithels in den Gewebeproben zu überprüfen. Zunächst wurden die präparierten Gewebeschnitte sorgfältig auf Objektträgern platziert. Nach einer Phase der Trocknung wurden zwei bis drei Tropfen Methylenblau-Lösung auf die Schnitte aufgebracht, was eine schnelle und effektive Färbung ermöglichte. Im Anschluss erfolgte die mikroskopische Betrachtung unter dem Olympus CHK Mikroskop (Olympus GmbH, Hamburg, Deutschland), um zu evaluieren, ob die spezifischen Schnitte für weitere detaillierte Färbungen geeignet waren. Sollte sich herausstellen, dass die Epithelstruktur beschädigt war oder die Färbung keine klare Darstellung bot, wurden nachfolgende Schnitte verworfen und die Suche nach optimalen Präparatstellen fortgesetzt, bis eine Probe mit klar erkennbaren und intakten Strukturen identifiziert wurde. Diese sorgfältige Auswahl gewährleistete, dass nur qualitativ hochwertige Proben in die weitere Analyse einbezogen wurden.

HE-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung), eine Kombination aus Hämalaun und Eosin, ist ein Standardverfahren zur detaillierten Darstellung von Gewebestrukturen [107]. Die Gewebeschnitte auf den Objektträgern wurden zunächst für 10 Minuten in Hämalaun (Roth, Karlsruhe, Deutschland) inkubiert, um die Kerne anzufärben. Anschließend erfolgte ein kurzes Spülen mit destilliertem Wasser (Milli-Q, Sigma Aldrich, St. Louis, USA), gefolgt von einer ausgiebigen Spülung unter fließendem Leitungswasser für 10 Minuten, um überschüssiges Hämalaun zu entfernen und die Färbung zu fixieren. Danach wurde das Gewebe kurz mit destilliertem Wasser gespült, bevor es für eine Minute in eine 0,1%ige Eosinlösung (Merck Millipore, Massachusetts, USA) gegeben wurde, welche für die Kontrastierung des Zytoplasmas und anderer Zellkomponenten sorgt. Nach einer abschließenden Spülung mit destilliertem Wasser waren die Schnitte bereit für die mikroskopische Untersuchung.

Immunhistochemie

In dieser Studie wurde die Immunfluoreszenz-Analyse verwendet, um die Präsenz von BC im Epithel des Trachealgewebes nachzuweisen. Die Analyse konzentrierte sich speziell auf das Epithel der Pars cartilaginea der Trachea. Diese Entscheidung beruhte auf früheren Erfahrungen und Beobachtungen, die darauf hindeuten, dass dieser Bereich eine erhöhte Dichte von BC aufweisen könnte. Unter Verwendung eines primären und eines sekundären Antikörpers wurden die BC visualisiert (s. Tabelle 8). In Anlehnung an die Methodik von *Duda* (2021) wurden die folgenden Antikörper ausgewählt:

Tabelle 8: Genutzte Primär- und Sekundärantikörper:

Primärantikörper				
Antigen	Wirt		Verdünnung	Quelle
DCAMKL1 (Doublecortin-like-kinase 1)	rabbit, polyklonal IgG Lot: GR3357375-1		1:800	Abcam; Cambridge, UK
Sekundärantikörper				
Antigen	Wirt	Konjugat	Verdünnung	Quelle
Donkey anti Rabbit	donkey Lot: 136387	Cyanin 3	1:1000	Dianova, Hamburg, Germany

Doublecortin-like Kinase 1 (DCAMKL1), eine Serin/Threonin-Proteinkinase, dient als spezifischer Marker für BC im Atemwegsepithel und ist wesentlich für deren Identifizierung und Charakterisierung verantwortlich [108]. Basierend auf einer detaillierten Analyse der Ergebnisse nach *Duda* (2021) wurde dieser Antikörper in folgenden Verdünnungen angewendet: 1:800.

Der sekundäre Antikörper Donkey anti-Rabbit IgG (Cy3) ist ein weit verbreitetes Reagenz, das gezielt Kaninchenimmunglobuline (Rabbit IgG) erkennt [109]. Dieser Antikörper ist mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cyanin 3 (Cy3) konjugiert, welcher eine intensive orange Fluoreszenz in immunhistochemischen und immunzytochemischen Anwendungen emittiert [110]. Dieser ist besonders nützlich, da er eine deutliche Unterscheidung von anderen Farbsignalen in Mehrfarben-Immunfärbungen ermöglicht. Für die Immunfärbung wurden sekundäre Antikörper in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt.

Zur Durchführung der immunhistologischen Färbung wurde das bewährte Grundprotokoll der AG Krasteva-Christ des anatomischen Instituts in Homburg herangezogen. Zunächst wurden die bei -20°C aufbewahrten Proben für eine Stunde akklimatisiert und getrocknet. Frische, nicht zuvor eingefrorene Proben erforderten lediglich eine halbe Stunde Trocknungszeit. Nach dem Entfernen des Tissue-Teks wurde das Gewebe mit einem Fettstift umrandet, um das Austreten der Detergenzien während der Inkubationen zu verhindern und so eine kontinuierliche

Feuchtigkeit zu gewährleisten. Eine weitere Stunde Trocknung folgte. Anschließend wurden 1-3 Tropfen von 0,3% Triton (Fluka, Buchs, Schweiz) aufgetragen, um die Zellmembranen der Gewebeschnitte zu permeabilisieren. Nachdem die Proben für 30 Minuten in einer Feuchtkammer ruhten, erfolgte das Trocknen mithilfe einer Vakuumpumpe (KNF Neuberger, Trenton, USA), wobei die Flüssigkeit innerhalb der vom Fettstift gezogenen Grenze belassen wurde, um das Gewebe vor Austrocknung zu schützen. Um unspezifische Bindungen des Primärantikörpers zu vermeiden, wurde anschließend Histo-Block-Lösung auf das Gewebe aufgetragen.

Nach der Vorbereitung wurden die Primärantikörper (PA) in einem Reaktionsgefäß mit PBS-S verdünnt und gründlich durchmischt. Anschließend wurden sie gleichmäßig auf die Präparate aufgetragen und zur Optimierung der Antikörperbindung über Nacht bei kontrollierter Temperatur inkubiert. Um die Spezifität der Antikörperbindung zu überprüfen, wurde konsequent eine Probe ausschließlich mit PBS-S behandelt, um als Negativkontrolle zu dienen. Am darauffolgenden Tag erfolgte das sorgfältige Waschen der Schnitte in PBS in drei Zyklen von jeweils 10 Minuten, um überschüssige Primärantikörper zu entfernen.

Nach dem Waschprozess wurde der zuvor in PBS-S verdünnte Sekundärantikörper (SA) hinzugefügt und für eine Stunde in einer feuchtigkeitsgesättigten Kammer inkubiert, um die Bindung an die Primärantikörper zu fördern. Der Sekundärantikörper wurde anschließend ebenso durch das Waschen in PBS in drei Zyklen von jeweils 10 Minuten entfernt. Für die darauffolgende Anfärbung der DNA wurden die Proben mit 100 µl 4,6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI, 0,2 µg/ml gelöst in PBS und 2 µg/ml gelöst in PBS) behandelt und wiederum für 10 Minuten in der Feuchtekammer inkubiert. DAPI, eine Verbindung, die sich vorzugsweise an AT-reiche DNA-Regionen anlagert, ermöglicht bei UV-Licht-Anregung eine deutliche Fluoreszenz, was die Identifizierung von Zellkernen erleichtert [111]. Ein abschließender Waschvorgang in PBS, durchgeführt in drei Zyklen von jeweils 10 Minuten, entfernte überschüssiges DAPI und bereitete die Schnitte für die mikroskopische Untersuchung vor. Nach dem Abschluss der Färbung wurde die Bindung zwischen den PA und SA im Gewebe durch Fixierung mit 4%igem Paraformaldehyd (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, USA) stabilisiert. Diese Inkubation dauerte 10 Minuten. Anschließend wurde das Gewebe dreimal für jeweils 10 Minuten in PBS gewaschen, um überschüssiges Fixativ zu entfernen und das Gewebe für die abschließende Eindeckung vorzubereiten. Für den letzten Schritt der Immunhistochemie wurde das Gewebe mit Mowiol (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) eingedeckt. Circa 2-3 Tropfen dieser Substanz wurden sorgfältig auf das Gewebe aufgetragen, bevor es mit einem Deckglas der Größe 24 × 60 mm

abgedeckt wurde. Dabei wurde besonderes Augenmerk darauf gelegt, Luftblasen zu entfernen, um eine klare Sicht auf die Präparate zu ermöglichen und gleichzeitig das Gewebe vor Austrocknung zu schützen. Die fertig vorbereiteten Proben wurden zur Lagerung in eine Mappe gelegt und bei einer Temperatur von 4°C im Kühlschrank aufbewahrt, um ihre Integrität bis zur Auswertung zu bewahren.

Die Bewertung der gefärbten Präparate erfolgte mittels des Fluoreszenzmikroskops Axio von Zeiss (Jena, Deutschland) in einem abgedunkelten Raum, um die Fluoreszenzsignale optimal zu erfassen. Das Mikroskop war mit einem Filter ausgestattet, der eine präzise Selektion der benötigten Wellenlängen ermöglichte und somit die gezielte Anregung der SA erlaubte. Dies führte zur effektiven Übertragung des von den Fluorochromen ausgesandten Lichts auf die Kamera, was eine genaue Quantifizierung der markierten Strukturen zuließ. Für die Analyse kam die Zeiss Zen Mikroskopie-Software zum Einsatz. Die Anregung der verwendeten Fluorochrome erfolgte bei Wellenlängen von 570 nm für Cy3 und 461 nm für DAPI, wodurch eine differenzierte Darstellung der spezifischen Gewebestrukturen erreicht wurde. Bei der Beurteilung der Schnitte lag der Fokus auf der Anzahl und Intensität der fluoreszierenden Objekte innerhalb der Schleimhaut. Hierzu wurden hochauflösende Aufnahmen mit einer 6-Kanal-Farb-Kamera erstellt, die in czi-Format gespeichert und für die Analyse später als tif-Dateien exportiert wurden.

Als Kontrollen dienten Präparate, die ohne Sekundärantikörper behandelt wurden, um unspezifische Bindungen oder autofluoreszierende Signale zu identifizieren. Diese Kontrollen waren entscheidend, um die Spezifität der SA zu bestätigen und das Risiko falsch-positiver Ergebnisse zu minimieren.

4. Ergebnisse

4.1 PTS-Erhöhung nach der Zugabe von Denatonium

Die Untersuchung des Einflusses von Denatonium auf den Partikeltransport von Dynabeads im Trachealgewebe wurde an sieben Wildtyp-Mäusen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die Zugabe von 15 μ l 1 mM Denatonium zu einem signifikanten Anstieg der PTS um $24,62 \pm 12,14$ μ m/s führte, mit einem p-Wert von 0,0017. Die Zugabe von 15 μ l 100 μ M ATP am Ende der Versuche resultierte durchgängig in einer signifikanten Steigerung der PTS, die um $60,53 \pm 30,61$ μ m/s zunahm, bei einem p-Wert von 0,002 (s. Abb. 9A).

Die Untersuchung an humanem Gewebe wurde an insgesamt zwölf Epithelproben von sieben Probanden (♀ n=3, ♂ n=4) durchgeführt. Die Applikation von 15 μ l 1 mM Denatonium führte zu einem signifikanten Anstieg der PTS um $17,43 \pm 16,27$ μ m/s ($p = 0,0034$). Ähnlich verursachte die Zugabe von 15 μ l 100 μ M ATP einen signifikanten Anstieg der PTS um $20,81 \pm 19,91$ μ m/s ($p = 0,004$) (s. Abb. 9B).

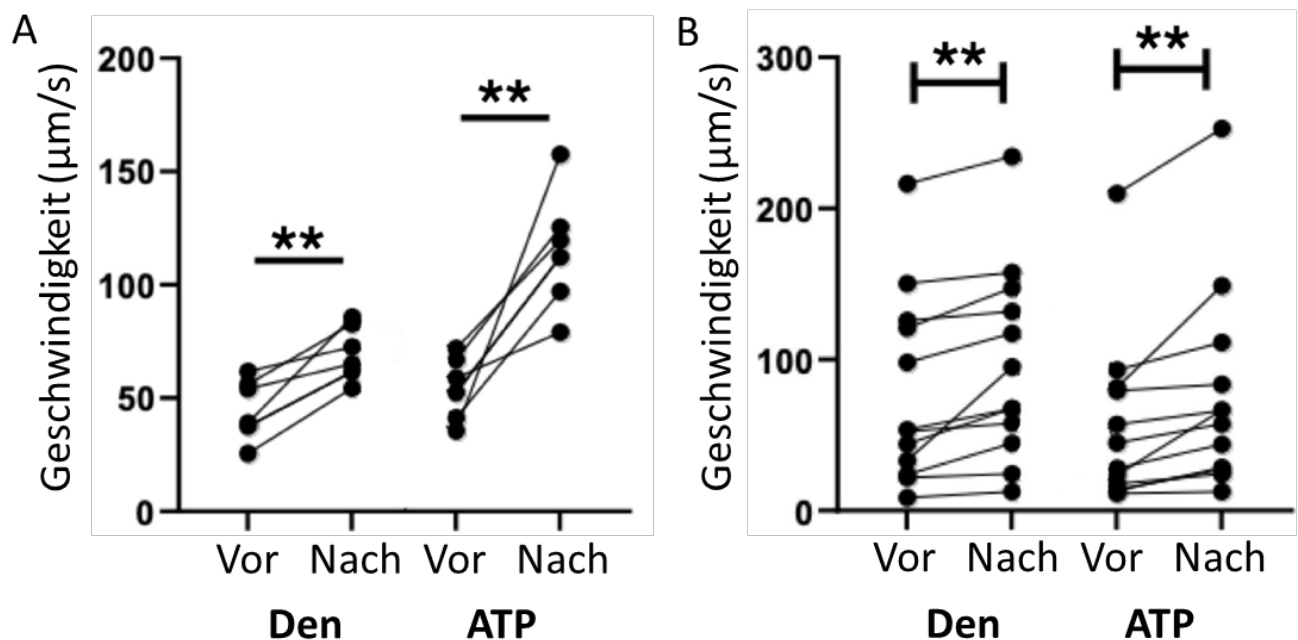


Abbildung 9: Partikeltransportgeschwindigkeit an einer isolierten Trachea nach Applikation von 1 mM Denatonium (Den) und 100 μ M ATP. A) Maus, n=7. B) Mensch, n=12. A-B) Dargestellt sind die PTS-Werte (y-Achse [μ m/s]) vor und nach der Gabe von Denatonium und ATP (x-Achse) aus einzelnen Versuchen. Die Applikation von Denatonium und ATP führte zu einem signifikanten Anstieg (A-B: Student's t-Test; Den **: $p \leq 0,01$; ATP **: $p \leq 0,01$). A) Den $p=0,002$; ATP $p=0,0034$. B) Den $p=0,0034$; ATP $p=0,004$.

Bei Frauen wurde nach der Gabe von 15 μ l 1 mM Denatonium ein durchschnittlicher Anstieg der PTS von $\approx 11,5$ μ m/s verzeichnet, während es bei Männern zu einem Anstieg von $\approx 18,5$ μ m/s gekommen ist.

4.1.1 Rolle von Bürstenzellen für die NO-Vermittelte Steigerung der PTS nach der Zugabe von Denatonium

Dieses Experiment wurde an insgesamt sechs Mäusen durchgeführt (s. Abb. 10A). Zu Beginn, in der 56. Minute, wurden 15 µl des nicht-selektiven NO-Synthase-Inhibitors L-Name (20 µM) hinzugefügt und sorgfältig vermischt. Es wurde kein Anstieg der PTS durch die darauffolgende Zugabe von 15 µl 1 mM Denatonium beobachtet. Darüber hinaus führte die Applikation von 15 µl 100 µM ATP zu einem signifikanten Anstieg der PTS um $49,60 \pm 15,40$ µm/s ($p = 0,0005$).

Weiterhin wurden acht humane Epithelproben analysiert, welche von sechs unterschiedlichen Körperspendern entnommen wurden. Analog zu den Beobachtungen bei Wildtyp-Mäusen erfolgte auch hier die Zugabe von 15 µl 20 µM L-Name. Nach der Applikation von 15 µl 1 mM Denatonium konnte keine Steigerung der PTS festgestellt werden (s. Abb. 10B). Des Weiteren bewirkte die Zugabe von 15 µl 100 µM ATP einen signifikanten Anstieg der PTS um $24,36 \pm 21,15$ µm/s ($p = 0,0139$).

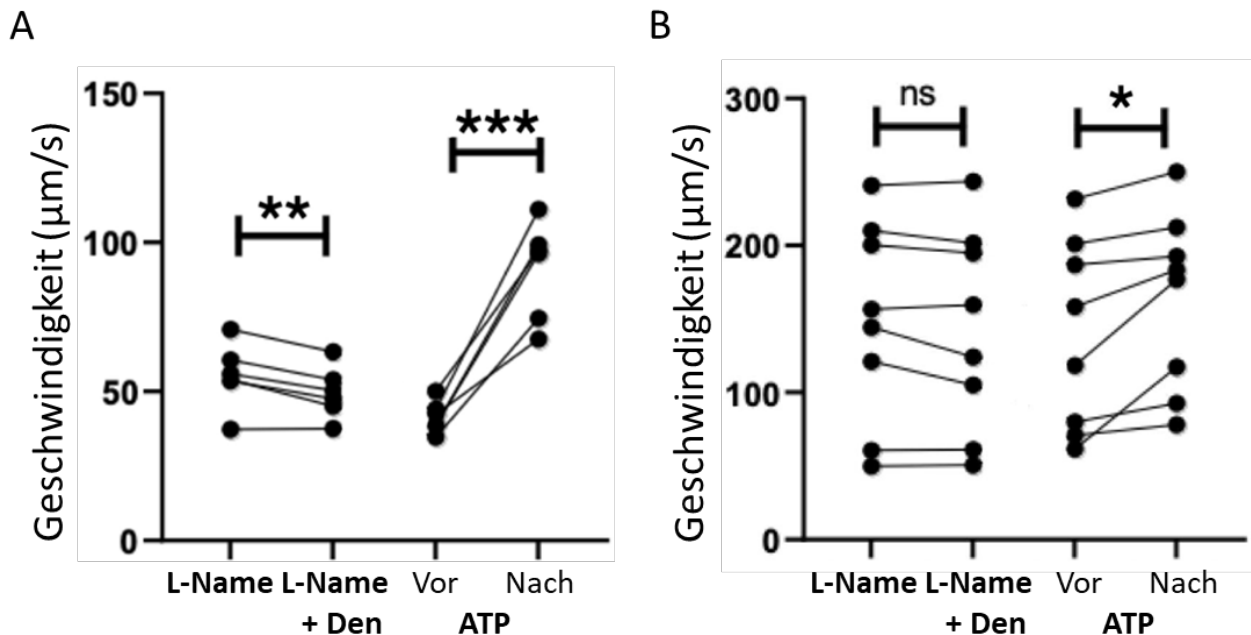


Abbildung 10: Partikeltransportgeschwindigkeit an einer isolierten Trachea nach Applikation von 20 µM L-Name, 1 mM Denatonium (Den) und 100 µM ATP. A) Maus, n=6. B) Mensch, n=8. A-B) Dargestellt sind die PTS-Werte (y-Achse [µm/s]) vor und nach der Gabe von Denatonium und ATP (x-Achse) aus einzelnen Versuchen. Nach der Applikation von L-Name war keine positive Stimulation der PTS durch Denatonium festzustellen. Die Zugabe von ATP hingegen führte zu einem signifikanten Anstieg (A: Student's t-Test; Den **: $p \leq 0,01$; ATP ***: $p \leq 0,001$; B: Student's t-Test; Den ns: $p > 0,05$; ATP *: $p \leq 0,05$). A) Den $p=0,0067$; ATP $p=0,0005$. B) Den $p=0,1297$; ATP $p=0,0139$.

4.1.2 Rolle von Bürstenzellen für die ACh-Vermittelte Steigerung der PTS nach der Zugabe von Denatonium

Um die cholinerge Rolle der Signalkaskade zu überprüfen, wurden die Acetylcholinrezeptoren durch Zugabe von Mecamylamin und Atropin zum Gewebe gehemmt. An murinem Gewebe wurde dieses Experiment bereits erfolgreich von Hollenhorst et al. (2020) durchgeführt, weshalb eine Wiederholung dieser Experimente nicht erforderlich war.

Das Experiment am humanen Gewebe wurde an sieben Epithelproben von fünf unterschiedlichen Probanden durchgeführt (s. Abb. 11). Zu Beginn erfolgte die Zugabe von 15 μ l 100 μ M Mecamylamin und 15 μ l 50 μ M Atropin. Anschließend wurden 15 μ l 1 mM Denatonium appliziert. Die Zugabe von Denatonium führte in Gegenwart der Inhibitoren Mecamylamin und Atropin zu keiner signifikanten Erhöhung der PTS. Zur weiteren Verifizierung der Reaktionsfähigkeit des Gewebes wurden zusätzlich 15 μ l 100 μ M ATP eingesetzt, was einen signifikanten Anstieg der PTS um $30,34 \pm 12,48$ μ m/s zur Folge hatte ($p = 0,0007$).

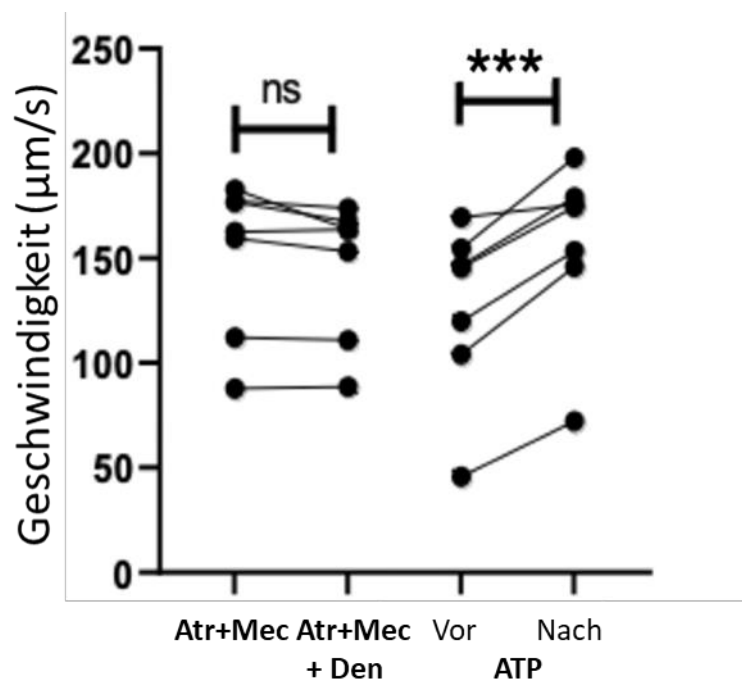


Abbildung 11: Partikeltransportgeschwindigkeit an einer isolierten Trachea nach Applikation von 50 μ M Atropin (Atr), 100 μ M Mecamylamin (Mec), 1 mM Denatonium (Den) und 100 μ M ATP. Mensch, $n=7$. Dargestellt sind die PTS-Werte (y-Achse [μ m/s]) vor und nach der Gabe von Denatonium und ATP (x-Achse) aus einzelnen Versuchen. Nach der Applikation von Atropin und Mecamylamin war keine positive Stimulation der PTS durch Denatonium festzustellen. Die Zugabe von ATP hingegen führte zu einem signifikanten Anstieg (Student's t-Test; Den ns: $p > 0,05$; ATP ***: $p \leq 0,001$). Den $p=0,874$; ATP $p=0,0007$.

4.1.3 Rolle der TRPM5-Kanäle für die Denatonium-Vermittelte Steigerung der PTS

Das Experiment wurde mit vier Gewebeproben von insgesamt drei unterschiedlichen Mäusen durchgeführt. Zu Beginn der Messungen wurden 15 μ l 100 μ M TPPO hinzugefügt, gefolgt von der Gabe von 15 μ l 1 mM Denatonium. Es konnte keine Erhöhung der PTS festgestellt werden. Die Zugabe von 15 μ l 100 μ M ATP ergab positive Ergebnisse. Es wurde eine Erhöhung der Geschwindigkeit um $42,11 \pm 26,11 \mu\text{m/s}$ ($p = 0,0484$) festgestellt (s. Abb. 12A).

In Übereinstimmung mit dem Verfahren bei Mäusen wurden beim menschlichen Gewebe ebenfalls 15 μ l 100 μ M TPPO hinzugefügt. Dieses Experiment wurde an vier Epithelproben von insgesamt drei Probanden durchgeführt (s. Abb. 12B). Die beobachtete Steigerung der PTS in Anwesenheit von Denatonium wurde durch den Inhibitor aufgehoben. Die Applikation von ATP führte zu einer Steigerung der PTS um $35,91 \pm 12,71 \mu\text{m/s}$ ($p = 0,011$).

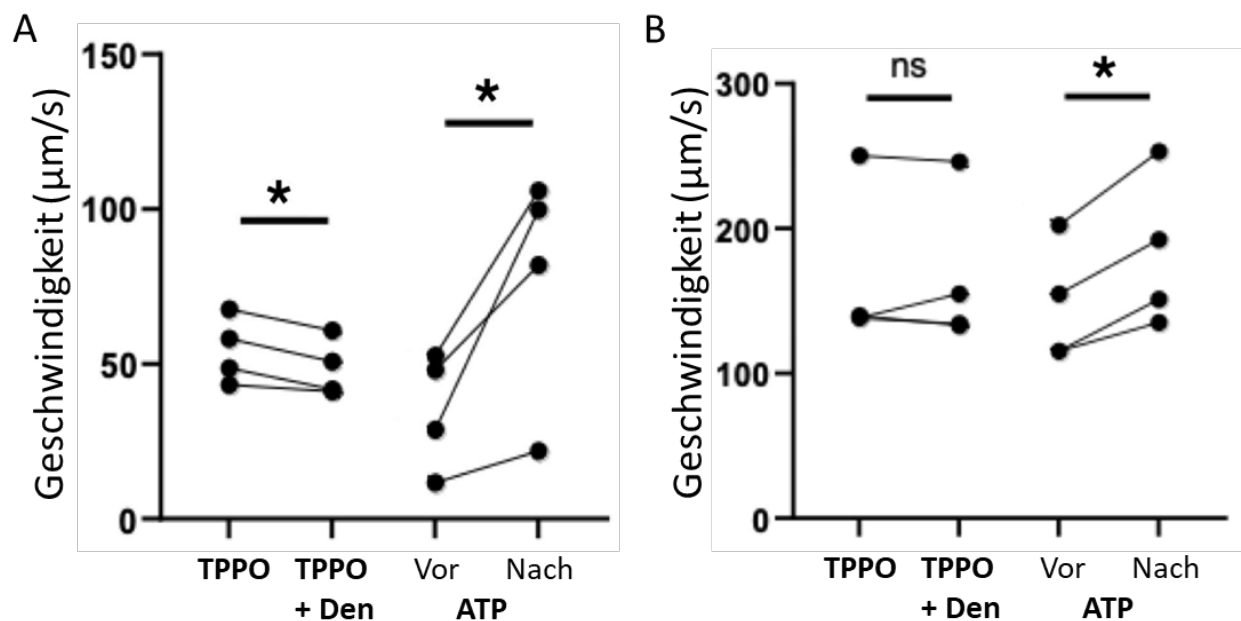


Abbildung 12: Partikeltransportgeschwindigkeit an einer isolierten Trachea nach Applikation von 100 μ M TPPO, 1 mM Denatonium (Den) und 100 μ M ATP. A) Maus, n=4. B) Mensch, n=4. A-B) Dargestellt sind die PTS-Werte (y-Achse [$\mu\text{m/s}$]) vor und nach der Gabe von Denatonium und ATP (x-Achse) aus einzelnen Versuchen. Nach der Applikation von TPPO war keine positive Stimulation der PTS durch Denatonium festzustellen. Die Zugabe von ATP hingegen führte zu einem signifikanten Anstieg (A: Student's t-Test; Den *: $p \leq 0,05$; ATP *: $p \leq 0,05$; B: Student's t-Test; Den ns: $p > 0,05$; ATP *: $p \leq 0,05$). A) Den $p=0,0169$; ATP $p=0,0484$. B) Den $p=0,944$; ATP $p=0,011$.

4.2 Zugabe von Chinin

Das Experiment wurde an acht Mäusen durchgeführt, wobei insgesamt neun Epithelproben entnommen wurden (s. Abb. 13A). In Analogie zum vorherigen Einsatz von Denatonium wurde 15 µl des Bitterstoffs Chinin in einer Konzentration von 10 mM hinzugefügt, was zu einer Endkonzentration von 100 µM führte. Daraufhin wurde die Reaktion der Proben gemessen. Es wurde keine Steigerung der PTS beobachtet; vielmehr zeigten die Messungen eine signifikante Hemmung der PTS. Eine anschließende Kontrollmessung mit 15 µl ATP führte jedoch zu einem signifikanten Anstieg der PTS um $27,88 \pm 24,09$ µm/s ($p = 0,0084$).

Im Anschluss wurden sieben Epithelproben von sieben menschlichen Probanden untersucht (♀ n=3, ♂ n=4). Zu Beginn des Experiments wurden 15 µl 100 µM Chinin zu den Proben hinzugefügt und vermischt (s. Abb. 13B). Die Ergebnisse zeigten eine signifikante Erhöhung der PTS um $5,56 \pm 2,76$ µm/s ($p = 0,0018$). Zusätzlich lieferte der Test mit 15 µl 100 µM ATP positive Ergebnisse, indem er eine Steigerung der PTS um $18,35 \pm 14,13$ µm/s bewirkte ($p = 0,0139$).

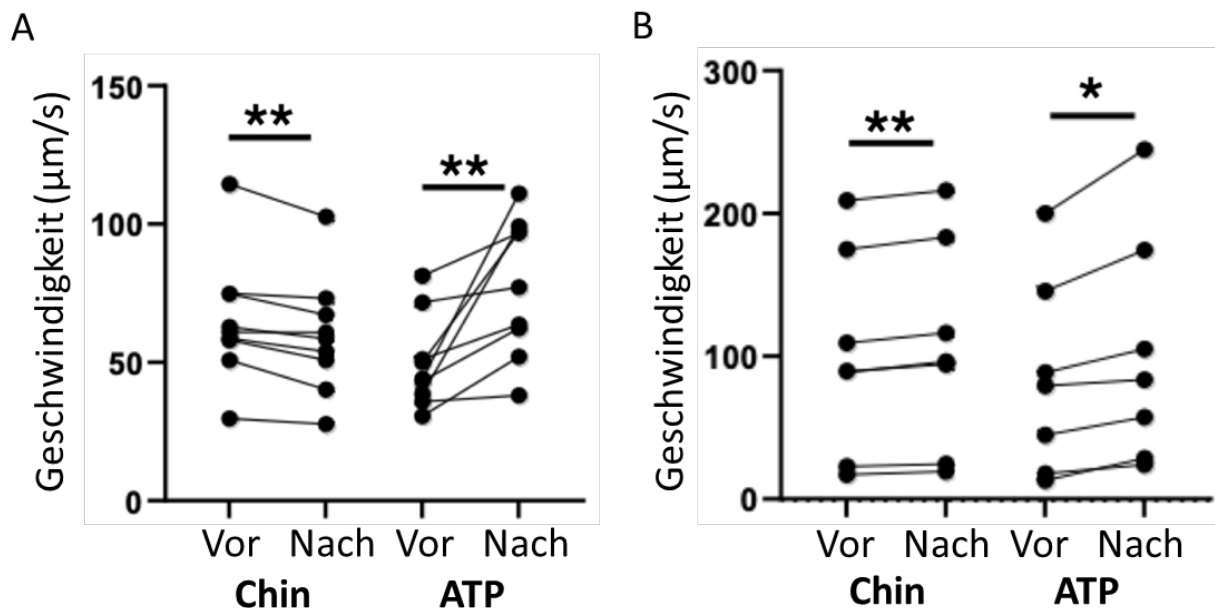


Abbildung 13: Partikeltransportgeschwindigkeit an einer isolierten Trachea nach Applikation von 100 µM Chinin (Chin) und 100 µM ATP. A) Maus, n=9. B) Mensch, n=7. A-B) Dargestellt sind die PTS-Werte (y-Achse [µm/s]) vor und nach der Gabe von Chinin und ATP (x-Achse) aus einzelnen Versuchen. Die Anwendung von Chinin führte bei Mäusen nicht zu einer Erhöhung der PTS, während sie bei Menschen eine positive Steigerung bewirkte. ATP führte bei beiden Spezies zu einem signifikanten Anstieg (A: Student's t-Test; Chin **: $p \leq 0,01$; ATP **: $p \leq 0,01$; B: Student's t-Test; Chin **: $p \leq 0,01$; ATP *: $p \leq 0,05$). A) Chin $p=0,0033$; ATP $p=0,0084$. B) Chin $p=0,0018$; ATP $p=0,0139$.

Bei Frauen wurde nach der Gabe von 15 µl 100 µM Chinin ein durchschnittlicher Anstieg der PTS von $\approx 23,5$ µm/s verzeichnet, während es bei Männern zu einem Anstieg von $\approx 13,8$ µm/s gekommen ist.

4.2.1 Rolle von Bürstenzellen für die NO-Vermittelte Steigerung der PTS nach der Zugabe von Chinin

Für diesen Versuch wurden sechs Proben von sechs unterschiedlichen Mäusen entnommen und analysiert (s. Abb. 14A). Trotz der Hemmung der NO-Synthese durch einen spezifischen Inhibitor wurde nach der Zugabe von 15 μ l 100 μ M Chinin ein moderater Anstieg der PTS um $3,07 \pm 2,40$ μ m/s ($p = 0,0276$) beobachtet. Die Kontrollmessungen mit ATP zeigten positive Ergebnisse, mit einem signifikanten Anstieg der PTS um $34,42 \pm 13,01$ μ m/s ($p = 0,0013$).

Die Auswirkungen von 15 μ l 100 μ M Chinin auf humanes Trachealgewebe wurden ebenfalls im Hinblick auf den Einfluss von NO-regulierten Prozessen untersucht (s. Abb. 14B). In diesem Versuch wurden neun Proben von insgesamt sechs Körperspendern eingeschlossen. Nach der Hemmung der NO-Synthese konnte keine signifikante Steigerung festgestellt werden. Die anschließende Applikation von ATP führte zu einem Anstieg der PTS um $30,92 \pm 20,61$ μ m/s ($p = 0,002$).

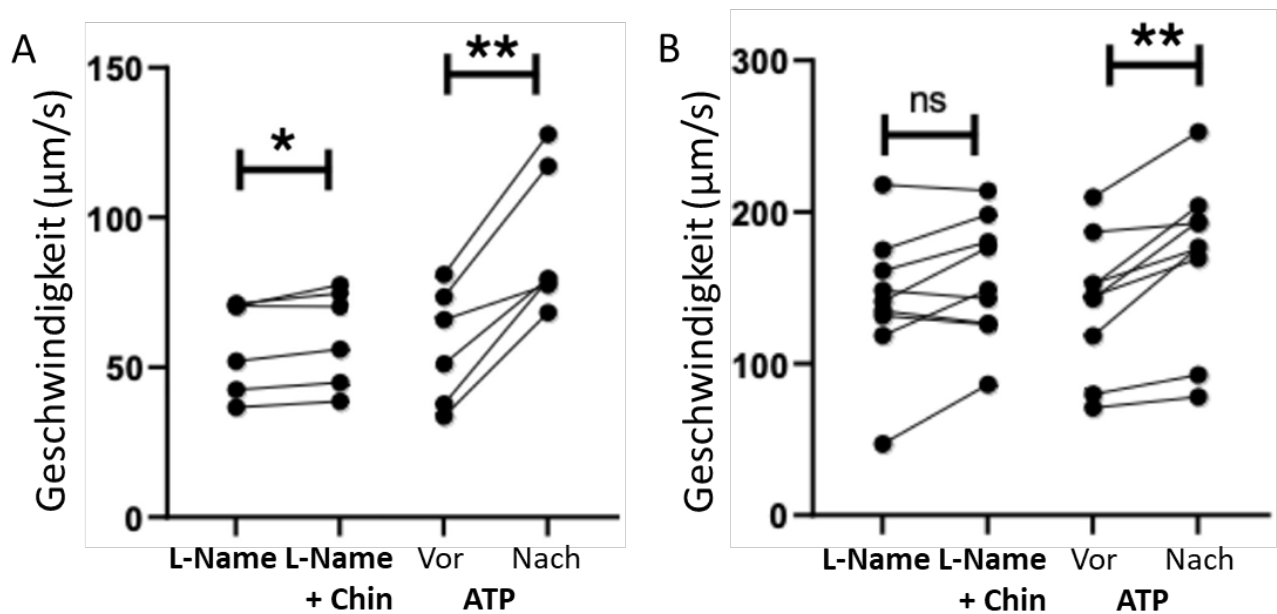


Abbildung 14: Partikeltransportgeschwindigkeit an einer isolierten Trachea nach Applikation von 20 μ M L-Name, 100 μ M Chinin (Chin) und 100 μ M ATP. A) Maus, $n=6$. B) Mensch, $n=9$. A-B) Dargestellt sind die PTS-Werte (y-Achse [μ m/s]) vor und nach der Gabe von Chinin und ATP (x-Achse) aus einzelnen Versuchen. Die Anwendung von Chinin führte bei Mäusen zu einer Erhöhung der PTS, während sie bei Menschen keine positive Steigerung bewirkte. ATP führte bei beiden Spezies zu einem signifikanten Anstieg (A: Student's t-Test; Chin *: $p \leq 0,05$; ATP **: $p \leq 0,01$; B: Student's t-Test; Chin ns: $p > 0,05$; ATP **: $p \leq 0,01$). A) Chin $p=0,0276$; ATP $p=0,0013$. B) Chin $p=0,0677$; ATP $p=0,002$.

4.2.2 Rolle von Bürstenzellen für die ACh-Vermittelte Steigerung der PTS nach der Zugabe von Chinin

In Anwesenheit von 15 μ l 100 μ M Mecamylamin und 15 μ l 50 μ M Atropin war keine signifikante Änderung der PTS durch 15 μ l 100 μ M Chinin zu beobachten. Es wurden insgesamt fünf Proben untersucht, welche von drei Mäusen stammten (s. Abb. 15A). Nach der Applikation von 15 μ l 100 μ M ATP wurde jedoch eine signifikante Steigerung der PTS um $25,34 \pm 10,28 \mu\text{m/s}$ beobachtet ($p = 0,0053$).

Das humane Gewebe zeigte, ähnlich wie das Gewebe von Wildtyp-Mäusen, keine Reaktion auf die Zugabe von 15 μ l 100 μ M Chinin, unter Inhibition der nAChR und mAChR mittels 15 μ l 100 μ M Mecamylamin und 15 μ l 50 μ M Atropin. In dieses Experiment wurden insgesamt fünf Körperspender einbezogen, aus welchen sieben Proben entnommen wurden (s. Abb. 15B). Die Überprüfung der Reaktionsfähigkeit des Gewebes mittels 15 μ l 100 μ M ATP-Zugabe erbrachte positive Ergebnisse. Es wurde ein signifikanter Anstieg der PTS um $32,40 \pm 19,19 \mu\text{m/s}$ festgestellt ($p = 0,0042$).

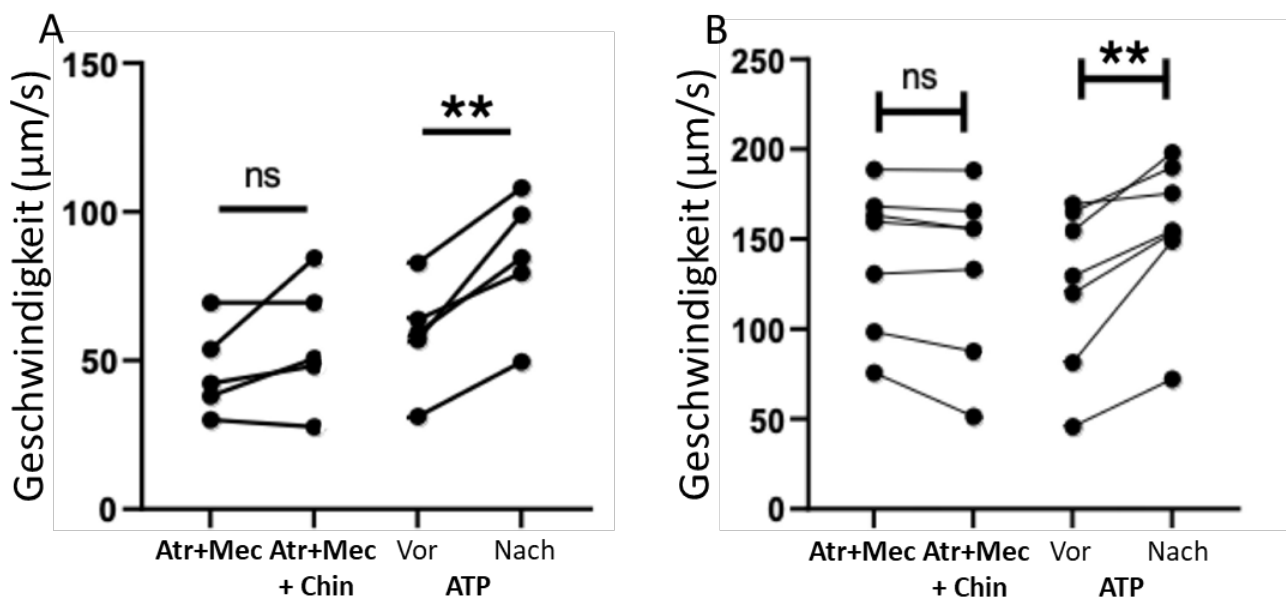


Abbildung 15: Partikeltransportgeschwindigkeit an einer isolierten Trachea nach Applikation von 100 μ M Mecamylamin (Mec), 50 μ M Atropin (Atr), 100 μ M Chinin (Chin) und 100 μ M ATP. A) Maus, n=5. B) Mensch, n=7. A-B) Dargestellt sind die PTS-Werte (y-Achse [$\mu\text{m/s}$]) vor und nach der Gabe von Chinin und ATP (x-Achse) aus einzelnen Versuchen. Die Anwendung von Chinin führte zu keiner Erhöhung der PTS, während ATP zu einem signifikanten Anstieg geführt hat (A-B: Student's t-Test Chin ns: $p > 0,05$; ATP **: $p \leq 0,01$). A) Chin $p=0,1884$; ATP $p=0,0053$. B) Chin $p=0,0874$; ATP $p=0,0042$.

4.3 PTS-Erhöhung nach der Zugabe von weiteren Bitterstoffen

Zur Bestätigung der Ergebnisse wurde die Reaktion der PTS nach Zugabe weiterer Stimuli (Diphenidol, Chlorpheniramin) gemessen. Insgesamt wurde Diphenidol an sieben Proben analysiert, welche von sechs Mäusen entnommen wurden (s. Abb. 16A). Die Ergebnisse zeigten nach der Zugabe von 15 μ l 1 mM Diphenidol eine Steigerung der PTS um $8,69 \pm 7,73 \mu\text{m/s}$ ($p = 0,0249$), was als positives Resultat gewertet wird. Die Zugabe von 15 μ l 100 μM ATP resultierte in einer signifikanten Erhöhung der PTS um $37,73 \pm 11,46 \mu\text{m/s}$ ($p = 0,001$). Chlorpheniramin wurde an fünf Proben untersucht, welche von fünf unterschiedlichen Mäusen entnommen wurden (s. Abb. 16B). Nach der Applikation von 15 μ l 300 μM Chlorpheniramin wurde eine signifikante Steigerung der PTS um $10,91 \pm 2,90 \mu\text{m/s}$ ($p = 0,0011$) beobachtet. Des Weiteren wurde nach der Zugabe von 15 μ l 100 μM ATP ein signifikanter Anstieg der PTS um $20,91 \pm 16,60 \mu\text{m/s}$ ($p = 0,048$) festgestellt.

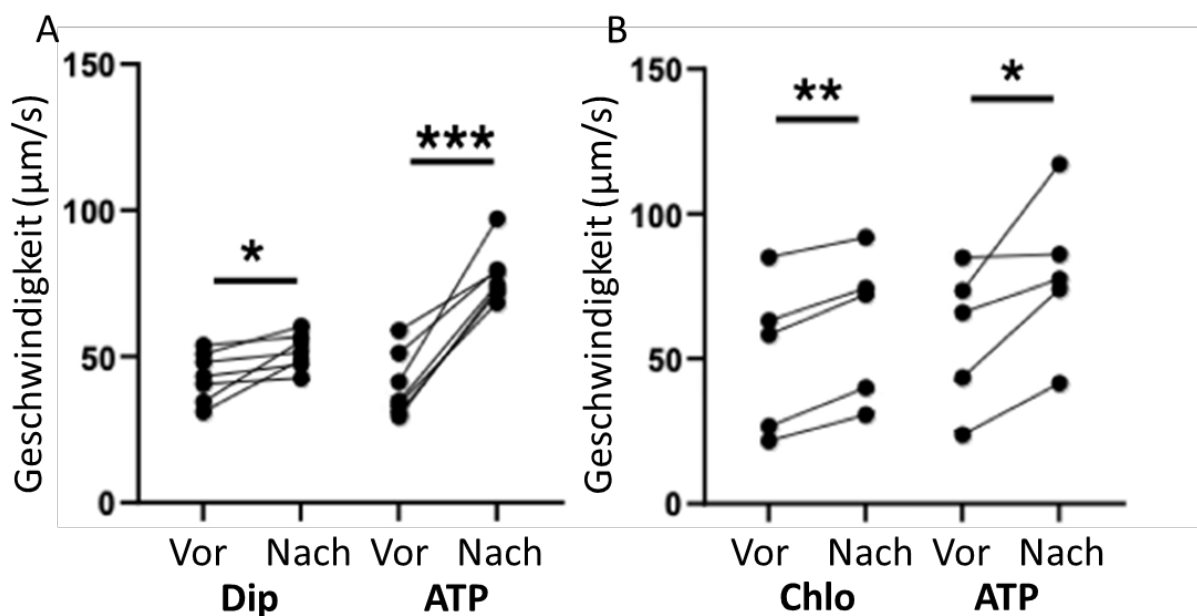


Abbildung 16: Partikeltransportgeschwindigkeit an einer isolierten murinen Trachea nach Applikation von A: 1 mM Diphenidol (Dip) und 100 μM ATP; B: 300 μM Chlorpheniramin (Chlo) und 100 μM ATP. A) $n=7$. B) $n=5$. A-B) Dargestellt sind die PTS-Werte (y-Achse [$\mu\text{m/s}$]) vor und nach der Gabe von Stimulus (A-Diphenidol; B-Chlorpheniramin) und ATP (x-Achse) aus einzelnen Versuchen. Die Anwendung von Diphenidol, Chlorpheniramin und ATP führte zu einem signifikanten Anstieg (A: Student's t-Test; Dip *: $p \leq 0,05$; ATP ***: $p \leq 0,001$; B: Student's t-Test; Chlo **: $p \leq 0,01$; ATP *: $p \leq 0,05$). A) Dip $p=0,0249$; ATP $p=0,001$. B) Chlo $p=0,0011$; ATP $p=0,048$.

Aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit des Probenmaterials von Körperspendern wurden diese beiden Stimuli jeweils an nur einer Epithelprobe getestet. Bei der Anwendung von 15 μ l 1 mM Diphenidol wurde eine Zunahme der PTS um $4,23 \mu\text{m/s}$ beobachtet, während die Applikation

von 15 μ l 300 μ M Chlorpheniramin eine Steigerung von 10,43 μ m/s zur Folge hatte. Aufgrund der geringen Datenmenge war es nicht möglich, den p-Wert zu berechnen. Die Applikation von ATP führte in beiden Fällen zu positiven Ergebnissen.

4.4 Einfluss von $[Ca^{2+}]_i$ und $[Ca^{2+}]_e$ -Konzentration auf PTS

Im Rahmen dieser Studie wurde in einigen Experimenten 15 μ l 10 μ M Ionomycin am Ende der Versuche zugegeben, um dessen Eignung als alternativen Indikator für die Zellreaktivität im Vergleich zu ATP zu untersuchen. Insgesamt wurden acht Proben von sechs Mäusen analysiert (s. Abb. 17A). Als Reaktion auf Ionomycin wurde eine signifikante Erhöhung der PTS um $11,17 \pm 3,54$ μ m/s beobachtet ($p = 0,0001$). Weiterhin wurden 15 μ l 10 μ M Thapsigargin den Proben hinzugefügt. Es wurden insgesamt sechs Epithelproben aus der Maus getestet (s. Abb. 17B). Diese Zugabe führte zu einer unmittelbaren Steigerung der PTS um $9,04 \pm 5,52$ μ m/s ($p = 0,0216$).

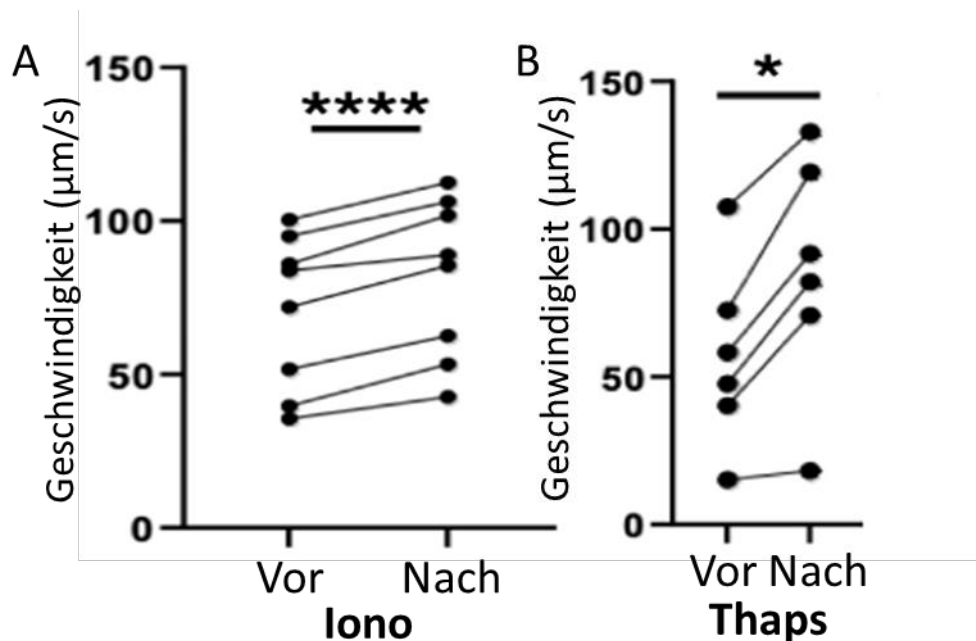


Abbildung 17: Partikeltransportgeschwindigkeit an einer isolierten murinen Trachea nach Applikation von A: 10 μ M Ionomycin (Iono); B: 10 μ M Thapsigargin (Thaps). A) $n=8$. B) $n=6$. A-B) Dargestellt sind die PTS-Werte (y-Achse [μ m/s]) vor und nach der Gabe von Stimulus (A-Ionomycin; B-Thapsigargin) aus einzelnen Versuchen. Die Anwendung von Ionomycin und Thapsigargin führte zu einem signifikanten Anstieg (A: Student's t-Test; Iono ****: $p \leq 0,0001$; B: Student's t-Test; Thaps *: $p \leq 0,05$). A) Iono $p=0,0001$. B) Thaps $p=0,0216$.

4.5 Immunhistologische Darstellung

Zur Differenzierung der Gewebeschichten und zur Beurteilung der Integrität der Proben kamen die Methylenblau- und die Hämatoxylin-Eosin-Färbung zum Einsatz. Die Methylenblau-Färbung wurde an insgesamt sieben Proben von fünf verschiedenen Körperspendern vorgenommen. Diese schnelle Färbetechnik erwies sich als effektiver Indikator zur Überprüfung der Vollständigkeit der Gewebeschnitte (siehe Abb. 18A). Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung wurde an insgesamt acht Proben von vier verschiedenen Körperspendern durchgeführt (siehe Abb. 18B). Nach einem *post mortem* Intervall von 8 bis 20 Stunden bestätigen die Färbungen, dass die Proben noch immer ein intaktes Epithel aufweisen.

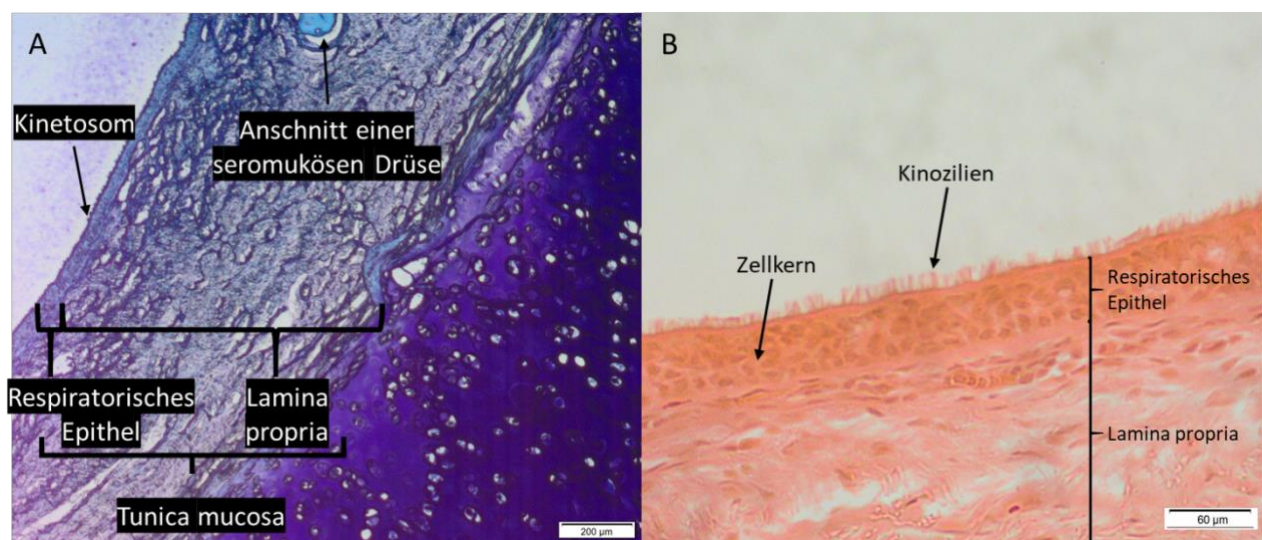


Abbildung 18: Exemplarische Darstellung der Integrität der Trachea und des respiratorischen Epithels, Mensch. A: Methylenblau-Färbung. *Tunica mucosa* mit dem angrenzenden Trachealknorpel sind sichtbar. Auffällig ist das Kinetosom des respiratorischen Epithels sowie ein Anschnitt einer seromukösen Drüse. Zudem sind mehrere Chondrozyten innerhalb des Knorpelgewebes erkennbar. B: Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Sichtbar ist das respiratorische Epithel mit Kinozilien und darunter liegenden Zellkernen, sowie die *Lamina propria*.

4.5.1 Immunfluoreszenz-Analyse

Die Immunfluoreszenz-Analyse wurde an insgesamt vier Gewebeproben von drei Körperspendern durchgeführt. Wie im Abschnitt 3.5.2 beschrieben, wurden ausgewählte Antikörper verwendet: DCAMKL1 in einer Verdünnung von 1:800 und Donkey anti-Rabbit in einer Verdünnung von 1:1000. Bei der initialen immunologischen Färbung wurde das Gewebe mit DAPI (0,2 µg/ml in PBS) bei einem pH-Wert von 7,4 behandelt. Diese Konzentration stellte sich jedoch als unzureichend heraus. Gemäß den Empfehlungen anderer Forschungsarbeiten, wie

beispielsweise von Wen et al. (2001), sollte die Minimalkonzentration von DAPI zwischen 1-3 µg/ml in einer Lösung mit 1% NP-40 und 0,1% Natriumcitrat bei einem pH-Wert von sechs liegen, um eine adäquate Markierung zu erreichen [112]. Aufgrund der gewonnenen Erkenntnisse wurde die Konzentration von DAPI auf 2 µg/ml in PBS angepasst. Nach dieser Anpassung erwies sich die Färbung als erfolgreich, und weitere Gewebeschnitte wurden mit dieser Konzentration behandelt (s. Abb. 19).

Unsere Immunfluoreszenz-Analyse hat BC in allen vier Gewebeproben der menschlichen Trachea nachgewiesen und visualisiert. Allerdings repräsentieren sie nur eine kleine Zellpopulation im respiratorischen Epithel der menschlichen Trachea (s. Abb. 19). Die Abbildung zeigt BC im humanen Trachealgewebe, die immunpositiv für den DCAMKL1-Antikörper markiert sind (s. Abb. 19 - Kreis). Diese Zellen präsentieren sich in unterschiedlichen Formen: Einige haben eine länglich-konische Gestalt mit einer feinen Spitze, die zur Basalmembran hin orientiert ist. Andere Zellen wirken runder und sind im Vergleich zum umgebenden Epithel kleiner. Es wird angenommen, dass das tracheale Ende dieser Zellen dicht mit Mikrovilli besetzt ist. Die spezifische Färbung ermöglicht es, diese Zellen deutlich zu identifizieren und sie klar von den benachbarten Zellstrukturen zu differenzieren.

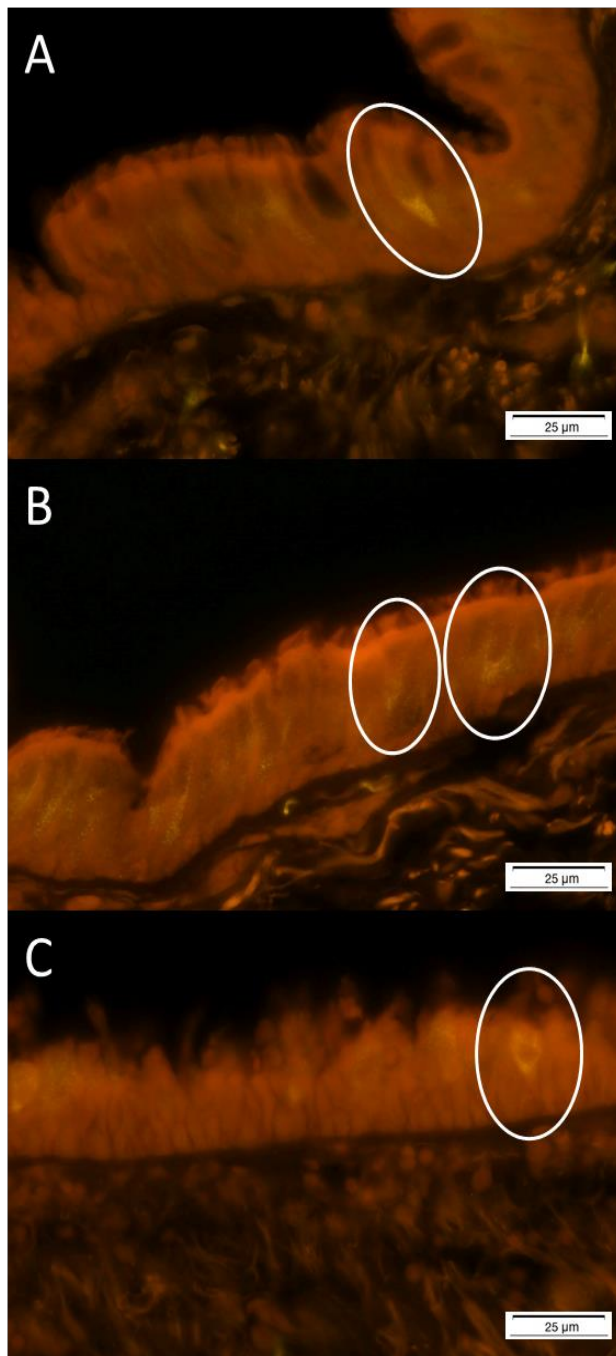


Abbildung 19: Exemplarische Darstellungen von Immunfluoreszenz-Färbungen des humanen trachealen Gewebes von drei verschiedenen Körperspender (A-C: DCAMKL1, 1:800; Donkey anti-Rabbit, 1:1000). A: Eine länglich geformte, positiv gefärbte Zelle ist umkreist. B: Zwei positive Zellen sind umkreist, von denen die linke weniger deutlich ist.. C: Eine runde, positiv gefärbte Zelle innerhalb des intakten respiratorischen Epithels.

5. Diskussion

5.1 *Post mortem* Intervall

Wir zeigen zum ersten Mal, dass es tatsächlich in einem *post mortem* Intervall, also der Zeitraum zwischen dem Tod eines Körperspenders und der Entnahme des Gewebes [130], bis zu 20 Stunden noch möglich war, eine messbare Aktivität der zilientragenden Zellen zu untersuchen. Als allgemeiner Indikator der zellulären Aktivität wurde in den Versuchen ATP genutzt [131]. ATP interagiert spezifisch mit den P2Y2- sowie den P2X-Rezeptoren [44,100,101,102] und bewirkt dadurch einen Calciumeinstrom, welcher die dauerhafte Aktivierung der zilientragenden Zellen auslöst [102]. Dadurch kann die MC gesteigert werden, was eine effizientere Reinigung der Atemwege zur Folge hat [66,132]. Die Antwort auf ATP-Exposition bestätigt die Reaktionsfähigkeit und Vitalität des Gewebes und potenziell falsch-negative Ergebnisse können damit vermieden werden [66]. Bei Mäusen wurde stets ATP als entscheidender Indikator für die Funktionalität des untersuchten Trachealepithels genutzt. Eine Arbeit von Do et al. (2018) bestätigte, dass durch die Zugabe von 100 μ M ATP eine signifikante Erhöhung der CBF erzielt werden kann. Die ATP-Freisetzung hängt von den Hemikanälen (Connexin/Pannexin) ab [71,131]. In Übereinstimmung mit dieser Abhängigkeit konnten diese Effekte in der Anwesenheit von 10 μ M Carbenoxolon (Pannexin-1-Blocker), 1 mM Probenecid (Pannexin-1-Blocker), 100 μ M Pyridoxalphosphat-6-azophenyl-20,40-disulfonsäure (P2X-Antagonist) und 300 μ M Flufenaminsäure (Connexin-Blocker) inhibiert werden [66]. Diese Ergebnisse wurden auch durch die Arbeit von Koizumi et al. (2016) und von Do et al. (2019) bestätigt [71,102]. Da jedoch über die humanen BC sehr wenig bekannt ist, war es unklar, ob ATP nicht bereits als Transmitter über BC wirken kann. Aus diesem Grund haben wir ebenfalls andere Substanzen wie Ionomycin und Thapsigargin verwendet, um die Reaktionsfähigkeit und Vitalität des Gewebes zu bestätigen [133]. Diese stimmten stets mit denen von ATP überein, sodass weiterhin nur ATP verwendet wurde.

Körperspender, deren Überführung in die Prosektur erst am folgenden Tag nach dem Versterben erfolgte (>20 Stunden), wiesen hingegen keine messbare Aktivität des respiratorischen Epithels auf, was in der fehlenden Reaktion auf die zugeführten Substanzen begründet liegt. Dadurch hat das Intervall eine entscheidende Rolle bei der Qualität des untersuchten Gewebes, da eine längere *post mortem* Zeit zu einem Verlust der Zellintegrität und -funktion führt [134], was die MC beeinträchtigen kann. Nach dem Tod neigen die Flimmerepithelzellen dazu aneinanderzuhaften und über längere Zeit hinweg ebenfalls zerstört zu werden, wie Untersuchungen an Mäusen gezeigt haben [135]. Dies verdeutlicht die essenzielle Bedeutung, eine verlängerte *post mortem* Zeit zu vermeiden, um die Zellintegrität und -funktion zu bewahren [134]. In dieser Forschungsarbeit stellte dies jedoch eine Herausforderung dar, wodurch viele

Körperspender für die Studie ausgeschlossen wurden. Der möglicherweise verzögerte Zeitpunkt der Todesfeststellung, die Ankunft der Bestattungsfirma und der Transport des Körperspenders in die Prosektur des anatomischen Instituts der Universitätsklinik Homburg resultieren häufig in einer *post mortem* Zeit über 20 Stunden.

Eine Lösung dieses Problems und eine Alternative zur ATP-Messung wurde von der Arbeitsgruppe Ferguson et al. im Jahr 1978 vorgestellt [136]. Sie entnahmen menschliches Tracheal- und Bronchialgewebe aus Autopsiefällen und legten es in eine modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung bei 37 Grad Celsius. Eine Mischung aus 95% Sauerstoff und 5% Kohlendioxid wurde durch die Lösung geleitet. Zwei Stunden nach der Äquilibration wurde das Gewebe elektrisch stimuliert und die physiologische Aktivität gemessen. Nach mindestens drei Stunden in der Krebs-Henseleit-Lösung zeigte das Gewebe deutliche Erholung von der Anoxiephase [136]. Diese Arbeit demonstrierte, wie durch gezielte Bedingungen und Stimulation die Funktionalität des Gewebes für die wissenschaftliche Analyse erhalten werden kann.

5.2 Entnahme des Epithels

Für unsere Versuche war es essenziell, dass die Signalkaskaden nicht in einem Zellkulturmodell erforscht werden, wie es bereits Lee mit dem Zellkulturmodell aus Sinusepithel durchgeführt hat [22], sondern an intaktem Gewebe. Eine der zentralen Fragen dieser Studie war daher, ob es möglich ist, ein Modell der menschlichen Trachea zu etablieren, um das respiratorische Epithel zu untersuchen. Dies wurde in unseren Versuchen erfolgreich durchgeführt, was die weiterführenden Experimente ermöglichte. Dennoch bleibt fraglich, inwieweit der Isolationsprozess das Gewebe unbeschadet ließ. Die Entnahme des Epithels aus der menschlichen Trachea stellte eine erhebliche Herausforderung dar. Die geringe Dicke der epithelialen Schicht im menschlichen respiratorischen Trakt, typischerweise zwischen 40 und 50 μm [149], machte das präzise Trennen des Epithels von den darunterliegenden Schichten ohne Beschädigung der zellulären Integrität äußerst schwierig. Um dieser Herausforderung wirksam zu begegnen, haben wir verschiedene Lösungsansätze implementiert:

- Gewebestreifen: Das Gewebe wurde in dünne Streifen geschnitten, jeweils mit etwa zwei Knorpelringen, um das Risiko einer Beschädigung der Epitheloberfläche durch direkten Kontakt mit den Instrumenten zu minimieren.
- Mikrochirurgische Werkzeuge: Es kamen mikrochirurgische Werkzeuge zum Einsatz, die eine präzisere Handhabung ermöglichten und somit die Gewebeschädigung verringerten.

- Temperaturkontrolle: Der Präparationsprozess wurde in einem auf 32°C erwärmten ME-Medium durchgeführt, um die vitale Funktion der Zellen zu erhalten und sicherzustellen, dass die physiologischen Bedingungen des Gewebes weitgehend intakt blieben. Die Wahl von 32°C statt 37°C dient dazu, den Zellstoffwechsel zu verlangsamen und die Zellviabilität während des Präparationsprozesses zu erhalten. Eine niedrigere Temperatur reduziert den Stoffwechselstress und die Aktivität von Enzymen, die bei höheren Temperaturen das Gewebe schädigen könnten [152]. Dadurch können die physiologischen Bedingungen des Gewebes während der Präparation besser erhalten bleiben.

Diese methodischen Anpassungen trugen maßgeblich dazu bei, die Integrität des Epithels während der Entnahme zu bewahren und die Qualität der Präparate für nachfolgende Untersuchungen zu optimieren [117]. Die Erfahrungen unterstreichen jedoch die Notwendigkeit einer kontinuierlichen Entwicklung und Anpassung von Methoden in der anatomischen Forschung, um den spezifischen Anforderungen des untersuchten Gewebetyps gerecht zu werden. Ein möglicher Ansatz zur Isolierung von Epithelzellen wurde bereits von Ohnishi et al. im Jahr 1999 vorgestellt [150]. Sie nutzten eine Methode, bei der Gewebestreifen mithilfe einer speziellen Montage befestigt wurden. Diese Streifen wurden dann in einem Medium, das EDTA enthielt, behandelt, um die Epithelschichten schonend von der unregelmäßigen Oberfläche der Mukosa zu lösen [150]. Ein innovativer Ansatz zur Isolierung von Epithelzellen wurde 2023 von Amosu et al. vorgestellt [151]. Diese entwickelten ein Gerät, das eigenständig eine mechanische Dissektion des Epithels durchführt. Eine bemerkenswerte Innovation liegt darin, dass dieses Gerät präzise Schnitte anfertigen kann, ohne das Gewebe mechanisch zu beschädigen [151].

5.3 Bitterstoffkaskade der BC in der menschlichen Trachea

Die Atemorgane kommen kontinuierlich in Kontakt zu mikrobieller Krankheitserreger und Toxinen über die eingeatmete Luft [113]. Zur effektiven Abwehr produziert das respiratorische Epithel Schleim, der antimikrobielle Peptide (AMPs) und Radikale enthält, die antibakterielle Eigenschaften aufweisen [50]. Der Schleim bettet die Eindringlinge ein und transportiert sie gezielt durch die MC aus dem Atemwegssystem [3,70], was einen zentralen Bestandteil der angeborenen Immunität darstellt und zur Reinigung der Atemwege beiträgt [70]. Wie Hollenhorst et al. (2020) herausfanden, werden bei Mäusen schützende Atemreflexe unter anderem durch die Aktivierung der BC initiiert [16]. Diese Zellen zeigen im murinem Gewebe eine erhöhte Expression von Genen für TAS2-Rezeptoren und TRPM5-Kanäle, die in der Signalübertragung von Geschmacksreizen eine wesentliche Funktion einnehmen [32,16,114]. Sie weisen

cholinerge Eigenschaften auf und initiieren durch die Zugabe von Bitterstoffen eine Erhöhung von PTS [16,115]. Bislang war unklar, ob vergleichbare Prozesse im respiratorischen Epithel der menschlichen Trachea auftreten und ob menschliche BC ähnliche chemosensorische und cholinerge Eigenschaften wie die von Mäusen aufweisen.

Wie bereits in der Einleitung dieser Arbeit erläutert, stammen die bisherigen Arbeiten zur Chemosensorik in den menschlichen Atemwegen hauptsächlich von der Arbeitsgruppe von Dr. Noham Cohen (University of Pennsylvania) [22,23]. Diese Erkenntnisse beruhen auf Daten aus den oberen Atemwegen (Sinusepithel) und bisher gab es keine Daten zu den unteren Atemwegen. Weiterhin wurden die Untersuchungen nicht an frisch explantierten primären Epithelzellen wie in unserer Arbeit, sondern an Air-Liquid-Interface-Kulturen durchgeführt [23]. Die cholinerge Eigenschaft der BC wurde in den funktionellen Untersuchungen von Lee et al. (2012) nicht überprüft. Darüber hinaus wurde kein histologischer Beweis über das Vorhandensein von BC in den untersuchten Zellkulturen erbracht [22]. Es ist möglich, dass in diesen Kulturen die cholinergen Zelltypen nicht erhalten geblieben sind, weil sie sehr schwierig zu kultivieren sind und dies bisher nur in der Arbeit von AG Saunders et al. (2014) gelungen ist [51].

Die BC sind seit langem in der menschlichen Trachea beschrieben [116]. In einer vorangegangenen Promotionsarbeit an unserer Arbeitsgruppe (N. Duda, 2021) wurden BC in den luftleitenden unteren Atemwegen (von der Trachea bis zu den Bronchiolen) mithilfe des Markerproteins POU2F3 nachgewiesen [117,118]. Dieses Protein wurde von Deprez et al. (2020) in ihrer Sequenzierungsstudie als Marker für menschliche BC beschrieben [11]. Zudem wurden mittels Immunhistochemie Zellen identifiziert, die die Proteine POU2F3, DCLK1 und CHAT in verschiedenen Bereichen der unteren Atemwege exprimieren [117]. Dies deutet darauf hin, dass diese Zellen cholinerge Eigenschaften aufweisen und dass es sich hier um BC handelt, da CHAT als Marker für tracheale BC bei Mäusen gilt [17] und POU2F3 ein Marker für menschliche BC ist [11]. Ziel meiner Arbeit war es, dies an explantierten menschlichen Tracheen zu untersuchen, ob die Geschmackstransduktionssignalkaskade in BC wie in Tiermodellen beschrieben auch in menschliche BC existiert und ob BC in der humanen Trachea cholinerge Eigenschaften aufweisen.

Wir haben bestätigt, dass BC im respiratorischen Epithel der menschlichen Trachea vorkommen. Wir konnten zeigen, dass die Bitterstoff-Stimulation des intakten Epithels der Trachea eine Wirkung auf die PTS und somit auch auf die MC hat. Die in dieser Arbeit eingesetzten Stimuli aktivieren klassisch Bitterstoffrezeptoren (TAS2R) und könnten somit die klassische Geschmackstransduktionssignalkaskade in Gang setzen [26,27,29]. Im Nasenepithel des

Menschen kommen TAS2R-Rezeptoren sowohl in chemosensorischen Zellen als auch möglicherweise in Flimmerepithelzellen vor [22]. Das TAS2R4-Transkript konnte im menschlichen Trachealepithel nachgewiesen werden, während das von Lee beschriebene TAS2R38-Transkript weniger eindeutig war [117]. Es ist jedoch bekannt, dass Denatonium auf mehrere menschliche Bitterstoffrezeptoren wirkt (s. Tabelle 1) [27]. Frühere Studien haben gezeigt, dass Bitterstoffrezeptoren auch in Flimmerepithelzellen der Trachea und Bronchien vorhanden sind, wobei die CBF bei Stimulation mit Denatonium erhöht wurde [119]. Dies wollten wir jedoch ausschließen und haben uns deswegen auf die cholinerge Eigenschaften der BC fokussiert.

In einer früheren Arbeit unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass die parakrinen Effekte von ACh durch 4-DAMP vollständig blockiert werden können [16]. Dies deutet darauf hin, dass insbesondere die M3- und M1-Rezeptoren eine zentrale Rolle in der Transmission der ACh-vermittelten Steigerung der MC übernehmen. Weiterhin wurde gezeigt, dass nAChR eine regulative Funktion im transepithelialen Ionentransport übernehmen und dadurch ebenfalls als Stimulator für MC bedeutend sind [47,120,121]. Kürzlich wurden die trachealen BC als Quelle für die nicht-neuronale cholinerge Reaktion des transepithelialen Ionentransports identifiziert [30,122]. Dies stimmt mit unseren Ergebnissen sowohl an murinem als auch menschlichem Gewebe überein. Dort führte die gleichzeitige Behandlung mit Mecamylamin (nAChR-Inhibitor) [63] und Atropin (mAChR-Inhibitor) [54] zu keiner Steigerung der PTS nach der Zugabe von Bitterstoffen kam. Wir vermuten, dass dieser Effekt in der menschlichen Trachea, ebenfalls wie in der murinen Trachea, durch cholinerge BC vermittelt wird, da dieser ACh-abhängig war und in der Trachea das synthetisierende Enzym von ACh und ChAT, nur in den BC des menschlichen Epithels nachgewiesen wurde (*Duda, 2021*). Dies unterstreicht, dass die Signalkaskade im menschlichen und murinen Gewebe auf einem ähnlichen Prinzip basiert. Dadurch könnten die menschlichen BC ACh freisetzen, was durch die parakrine Wirkung auf den benachbarten Flimmerzellen eine Erhöhung der MC induzieren würde [16]. Eine ähnliche Wirkung durch ACh ist auch in der Nasenschleimhaut des Menschen zu beobachten [66,102]. In diesen Studien wurde jedoch nicht festgestellt, ob dieser Effekt durch die Signalkaskade der BC induziert wird [44,66,102].

Bei Mäusen ist bekannt, dass die Expression von TRPM5 ausschließlich in chemosensorischen Zellen erfolgt [16,114]. Darüber hinaus zeigt sich eine hohe Bedeutung von TRPM5 in den murinen Bürstenzellen der Trachea, da die Aktivierung dieser Zellen durch Bitterstoffe zu einem Anstieg des intrazellulären Kalziumspiegels führt, welcher wiederum den TRPM5 aktiviert, was nachfolgend die Freisetzung von ACh aus epithelialen Bürstenzellen der murinen Trachea

bewirkt [16,123]. Dieses löst durch eine parakrine Wirkung die Steigerung der MC aus [16,50]. Bei Lee et al., (2012, 2014) wurde eine TRPM5-Abhängigkeit der Antwort nicht nachgewiesen [22]. In der vorliegenden Arbeit konnten wir zum ersten Mal Hinweise bekommen, dass der TRPM5 Kanal in humanen Trachealzellen vorhanden ist und funktionell aktiv ist. Er scheint essenziell für die Ausschüttung von ACh zu sein, da die beobachtete Steigerung der PTS in Anwesenheit von Denatonium und Chinin durch die Inhibition des Kanals mit 15 µl TPPO (100 µM) aufgehoben werden konnte. Unsere Untersuchung bestätigte unsere Hypothese, dass die eingesetzten Bitterstoffe ihre Wirkung über eine Aktivierung der Bitterstoffkaskade in BC vermitteln. Somit konnten wir in dieser Arbeit zum ersten Mal zeigen, dass BC in menschlichem Epithel vorkommen und funktionell aktiv sind. Ähnliche Ergebnisse wurden kürzlich bei Mäusen beobachtet [16]. Diese Parallelen bestärken die Annahme, dass TRPM5-Kanäle eine universelle Funktion bei der Auslösung von Reinigungsmechanismen in den Atemwegen über Speziesgrenzen hinweg haben [114,117]. Dies betont die Relevanz muriner Modelle für das Verständnis menschlicher physiologischer Prozesse. Die Ausweitung dieser Forschung auf das menschliche Trachealepithel ist besonders interessant, da sie Aufschluss über die mögliche Bedeutung der TRPM5-Kanäle bei der Regulierung der Atemwegsfunktionen beim Menschen geben könnte [124].

Der zugrundeliegende Mechanismus umfasst neben ACh auch NO, da meine Ergebnisse zeigen, dass die durch Bitterstoffe bedingte Erhöhung der MC durch die Blockade von NOS aufgehoben wurde (s. Abb. 10, 14). Lee et al. (2012) haben gezeigt, dass die Zugabe von Bitterstoffen im respiratorischen Epithel der Nasennebenhöhlen zur Produktion des NO-Transmitters führt [22]. Diese Ergebnisse wurden von Carey et al. (2022) bestätigt, welche nachwiesen, dass die Aktivierung von Bittergeschmacksrezeptoren im nasalen Flimmerepithel durch *Pseudomonas aeruginosa* zur NO-Produktion führt [24], was eine Schlüsselrolle in der angeborenen Immunantwort spielt, indem es sowohl die MC als auch die antibakterielle Aktivität in den Atemwegen verstärkt [125]. Die genaue Signalkaskade und ob dieser Prozess über die BC verläuft, ist jedoch unklar. Lee verwendete Air-Liquid-Interface-Kulturen, in welchen die Epithelzellen kultiviert wurden, wodurch die Anwesenheit dieser chemosensorischen Zellen fragwürdig ist [22]. Bitterrezeptoren sind auch auf zilientragenden Zellen vorhanden [22,119], daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass die NO-Produktion in seiner Arbeit über diesen Zelltyp erfolgte. Wir vermuten, dass das von den BC freigesetzte ACh parakrin auf die Flimmerzellen wirkt und dadurch die NOS in diesen Zellen stimuliert [117]. Diese Annahme wird durch die Entdeckung von Perniss et al. (2023) an murinem Trachealgewebe unterstützt. Ihre Forschung zeigt, dass die Aktivierung von BC zur Freisetzung von ACh führt, welches

benachbarte Zellen stimuliert und über Gap-Junction-Signale eine Ca^{2+} -Welle auslöst, die auch angrenzende Flimmerepithelzellen erreicht [122]. Durch die Bindung von Ca^{2+} an Calmodulin kann NOS aktiviert werden [68,83]. Daher könnte das von den BC freigesetzte ACh eine Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels in den Flimmerzellen bewirken und dadurch die NO-Produktion anregen. Es ist jedoch auch möglich, dass NOS in den BC selbst vorhanden ist und diese somit eigenständig NO produzieren. Das Vorhandensein von NOS in den BC der Magenkardia und des Pankreas bei Ratten ist bereits seit längerem bekannt [126].

Um den Signalweg besser zu verstehen, untersuchten Alberty et al. (2004) die Wirkung von L-Name, einem Inhibitor der NO-Synthase [82,127], auf die iNOS im humanen nasalen Flimmerepithel [80]. Die Studie zeigte, dass entzündungsfördernde Substanzen die induzierbare NO-Synthase im Atemwegsepithel hochregulieren, während die Hemmung der endogenen NO-Produktion die Grundfrequenz des Zilienschlags reduziert [80]. In dieser Studie wurde das Ausmaß der cholinergen Zilienstimulation als unabhängig von der NO-Produktion beschrieben [80]. Diese Hypothese wurde auch von Mikhailik et al. (2021) bestätigt, die in murinen Modellen herausfanden, dass die NO-Produktion eine positive Wirkung auf die CBF hat und dass die Signalkaskade über Guanylatcyclase vermittelt wird [68]. Carey et al. (2017) identifizierten humane Krankheitserreger, darunter den grampositiven, aeroben *Bacillus cereus*, der ebenfalls durch TAS2-Rezeptoren die Produktion von NO auslösen können [128]. In der vorliegenden Studie wurde untersucht, ob der Mechanismus der BC in der menschlichen Trachea ähnlich funktioniert, wie in bisherigen Arbeiten beschrieben. Dazu wurde die NOS im Trachealepithel ebenfalls mit L-Name inhibiert und anschließend ein Bitterstoff hinzugefügt, um die Reaktion der MC zu beobachten. Die Hemmung der NOS unterdrückte sowohl im murinen als auch im menschlichen Gewebe signifikant die Erhöhung der MC. Dies deutet darauf hin, dass die Aktivierung der MC in den menschlichen Proben [22,80], ähnlich wie im Maus- [68,86] oder Froschmodell [85], von der Verfügbarkeit von NO im Rahmen der NO-abhängigen bitteren Signalkaskade abhängt. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von Alberty et al. (2004) und Mikhailik et al. (2021) [68,80]. Diese Ergebnisse unterstreichen die zentrale Rolle der NO-Signalkaskade in der Regulation der MC im respiratorischen Epithel der Trachea. Ein Mangel an NO in den Flimmerzellen des Menschen wird mit Beeinträchtigungen der Zilienaktivität in Verbindung gebracht, was die geringen Mengen an NO erklärt, die bei Ziliopathien ausgeatmet werden [68]. Ein künstlicher NO-Spender, wie Natriumnitroprussid, könnte diesem Problem entgegenwirken, was bereits an murinem Gewebe erforscht wurde und zur Erhöhung der MC führte [129].

5.4 Einfluss von verschiedenen Faktoren auf die MC beim Menschen

Die Überprüfung der Vitalität und *post mortem* Aktivität des respiratorischen Epithels im menschlichen Gewebe wurde durch die Reaktion auf Bitterstoffe und ATP verdeutlicht. Bei nahezu jeder Messung der PTS wurde jedoch eine variierende Baseline festgestellt. Die Unterschiede können durch eine Vielzahl von Faktoren wie den Gesundheitszustand oder das Alter bedingt sein [91,137,138]. Leider fehlen uns manche Informationen über die Körperspender, da zum Beispiel verschiedene Krankheiten die zilienträgenden Zellen direkt beeinträchtigen [36]. Typischerweise gehen solche Erkrankungen mit einer gestörten MC einher, was eine ziliäre Dysfunktion nach sich ziehen kann [36,70]. Eine derartige Dysfunktion führt oft zu einer Hyperplasie und Hypertrophie der Becherzellen und seromukösen Drüsen, was wiederum eine vermehrte Sekretansammlung bewirkt [65,139]. Ein Beispiel für eine Erkrankung mit vermehrter Sekretansammlung ist Mukoviszidose [140]. Darüber hinaus gibt es auch genetische Erkrankungen, wie die primäre ziliäre Dyskinesie, bei denen ebenfalls die MC beeinträchtigt ist [141]. In unserer Studie wurde jedoch darauf geachtet, keine Körperspender einzubeziehen, die an bekannten Atemwegserkrankungen litten. Allerdings ist die Diagnose von Atemwegserkrankungen, besonders bei älteren Menschen, oft nicht optimal und viele Betroffene sind sich ihrer Erkrankung möglicherweise nicht bewusst [142]. Daher könnte es sein, dass auch Personen mit unerkannten Atemwegserkrankungen in der Studie eingeschlossen wurden, was die Stärke der Effekte beeinflussen haben könnte. Weiterhin fehlte uns die Information über den regelmäßigen Konsum von Tabakprodukten. Diese bedingen strukturelle Veränderungen sowie Funktionsstörungen in den Atemorganen und wirken sich ebenfalls negativ auf die MC aus [143]. Die Störungen treten nicht ausschließlich bei aktivem Rauchen auf, sondern ebenso beim Passivrauchen [143,144]. Die verringerte Funktionsfähigkeit der MC durch langanhaltende Exposition gegenüber Tabakrauch wird durch eine Reihe von Ursachen hervorgerufen, einschließlich der Beschädigung der Zilien, einer gesteigerten Produktion und veränderten Beschaffenheit des Schleims, dem Abbau der Schutzbarriere der Atemwege sowie einem vermehrten oxidativen Stress und entzündlichen Prozessen [144,145].

Ein weiterer Faktor, welcher eine bedeutende biologische Variable für die Immunität darstellt, ist das Geschlecht. Geschlechtsspezifische Faktoren, wie Chromosomen und Gonadenhormone, tragen zur Bildung verschiedener Sexualhormone bei, die wiederum eine wesentliche Rolle bei der Immunantwort im respiratorischen Trakt des Menschen spielen [146]. Unterschiede in den Sexualhormonen können zu geschlechtsspezifischen Reaktionen der BC führen. Dies lässt sich aus meinen Versuchen vermuten, da bei Frauen nach der Gabe von 15 µl 1 mM Denatonium ein durchschnittlicher Anstieg der PTS von $\approx 11,5$ µm/s verzeichnet wurde, während es bei Männern

zu einem Anstieg von $\approx 18,5 \mu\text{m/s}$ kam. Nach der Gabe von $15 \mu\text{l}$ $100 \mu\text{M}$ Chinin wurde bei Frauen ein durchschnittlicher Anstieg der PTS von $\approx 23,5 \mu\text{m/s}$ festgestellt, während es bei Männern zu einem Anstieg von $\approx 13,8 \mu\text{m/s}$ kam. Dies widerspricht jedoch den Ergebnissen der Studie von Kao et al. aus dem Jahr 1994, welche keinen signifikanten Einfluss des Geschlechts auf die MC feststellten [138]. In dieser Studie wurde ein einzelner Tropfen Tc-99m MAA auf den Boden des Nasengangs aufgetragen und dessen Weg mithilfe einer Gammakamera verfolgt. Die MC wurde als Geschwindigkeit in mm/Minute gemessen [138].

5.5 Vergleich der Sensitivität der TAS2R auf Chinin

In meinen Ergebnissen zeigten Maus und Mensch unterschiedliche Reaktionen auf die Gabe von $100 \mu\text{M}$ Chinin. Dies könnte auf die unterschiedliche Zusammensetzung der TAS2R-Rezeptoren bei der Detektion von Chinin zurückzuführen sein, da es signifikante Unterschiede zwischen Menschen und Mäusen gibt. Während beim Menschen insgesamt neun Rezeptoren für die Erkennung von Chinin verantwortlich sind [29], verfügen Mäuse über sieben spezifische Rezeptoren [27]. In der vorliegenden Arbeit zeigten murine Modelle keine signifikante Steigerung der PTS nach der Zugabe von $100 \mu\text{M}$ Chinin, im Gegensatz zur positiven Reaktion auf 1 mM Denatonium. Diese Beobachtung könnte auf die unterschiedlichen Konzentrationen der Substanzen zurückzuführen sein. In der Studie von Damak et al. (2006) wurde festgestellt, dass $100 \mu\text{M}$ Chininsulfat die niedrigste Konzentration war, auf die die Mäuse noch reagierten und sie vermieden [34]. Diese Beobachtung stimmt nicht vollständig mit meinen Ergebnissen überein, es lässt sich jedoch erkennen, dass $100 \mu\text{M}$ Chinin eine kritische Schwelle darstellt, unterhalb derer keine Reaktion mehr beobachtet wird [34]. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Beobachtungen von Spector et al. (2002) bei Ratten [147]. In dieser Studie wurde die Reaktion von Ratten auf Chinin bei Konzentrationen von $100 \mu\text{M}$ und 1 mM untersucht, wobei festgestellt wurde, dass 1 mM etwa doppelt so effektiv war [147].

Es ist wichtig zu betonen, dass die Unterschiede in den experimentellen Ergebnissen auf eine Vielzahl von Faktoren zurückgeführt werden können, einschließlich der eingesetzten Konzentrationen. Bei humanen Gewebeproben induzierte die Zugabe von Chinin in derselben Konzentration eine signifikante Steigerung der PTS, was den Kontrast zu den Ergebnissen bei murinen Modellen markiert. Dazu kommen signifikante Unterschiede in der Geschmackswahrnehmung und Rezeptorexpression zwischen Menschen und Mäusen [27,29,148]. Diese unterschiedlichen Rezeptorprofile könnten somit zu den verschiedenen Reaktionen auf Chinin beitragen. Die Spezies-spezifischen Unterschiede in der Reaktion auf Bitterstoffe wie Chinin und Denatonium verdeutlichen die Notwendigkeit, bei der Übertragung

von Erkenntnissen aus tierischen Modellen auf den Menschen vorsichtig vorzugehen und die evolutionären Anpassungen der Geschmackswahrnehmung zu berücksichtigen.

5.6 Schlussfolgerung und Ausblick

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die MC in der menschlichen Trachea durch ähnliche Mechanismen wie im murinen Gewebe reguliert wird. BC spielen dabei eine entscheidende Rolle, indem sie ACh freisetzen, das parakrin auf benachbarte Flimmerzellen wirkt und deren mukoziliäre Aktivität erhöht. Nicht nur ACh, sondern auch NO ist eine wesentliche Komponente dieses Prozesses, was durch die Blockade der NOS und die dadurch aufgehobene Steigerung der MC durch Bitterstoffe belegt wird.

Der TRPM5-Kanal ist in menschlichen Trachealzellen vorhanden und funktionell aktiv. Dieser Kanal ist essenziell für die Freisetzung von ACh, da die durch Bitterstoffe induzierte Erhöhung der MC durch die Hemmung des TRPM5-Kanals aufgehoben werden kann. Bitterstoffe wirken somit über die Aktivierung der Bitterstoffkaskade in den BC. Zudem erfüllen TRPM5-Kanäle eine zentrale Rolle bei Reinigungsmechanismen in den Atemwegen.

Eine weitere wichtige Erkenntnis ist, dass die Aktivität der zilientragenden Zellen bis zu 20 Stunden nach dem Tod eines Körperspenders messbar bleibt. Wird ein Körperspender jedoch erst am nächsten Tag nach dem Tod überführt, zeigt das respiratorische Epithel keine messbare Aktivität mehr.

Diese neuen Einsichten in die Regulation der MC in der menschlichen Trachea verdeutlichen die Bedeutung der BC in diesem Prozess. Sie erweitern das Verständnis der körpereigenen Abwehrmechanismen gegen respiratorische Pathogene und könnten neue therapeutische Ansätze bei der Behandlung von Atemwegserkrankungen ermöglichen, indem sie spezifische zelluläre Ziele für zukünftige pharmakologische Interventionen aufzeigen.

6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Kulturschälchen mit aufgespannten murinem Trachealgewebe _____	22
Abbildung 2:	Mikroskop- und Temperaturüberwachungssystem _____	23
Abbildung 3:	Graphische Darstellung des allgemeinen Protokolls für das erste murine Trachealgewebe _____	23
Abbildung 4:	Graphische Darstellung des konkreten Protokolls für das erste murine Trachealgewebe _____	24
Abbildung 5:	Graphische Darstellung des konkreten Protokolls für das zweite murine Trachealgewebe _____	25
Abbildung 6:	Frisch entnommene menschliche Trachea _____	27
Abbildung 7:	Graphische Darstellung des allgemeinen Protokolls für das humane Gewebe _____	28
Abbildung 8:	Graphische Darstellung des konkreten Protokolls für das humane Trachealgewebe _____	28
Abbildung 9:	Partikeltransport an einer isolierten Trachea nach Applikation von 1 mM Denatonium und 100 μ M ATP (Maus, Mensch) _____	35
Abbildung 10:	Partikeltransport an einer isolierten Trachea nach Applikation von 20 μ M L-Name, 1 mM Denatonium und 100 μ M ATP (Maus, Mensch) _____	36
Abbildung 11:	Partikeltransport an einer isolierten Trachea nach Applikation von 100 μ M Mecamylamin, 50 μ M Atropin, 1 mM Denatonium und 100 μ M ATP (Mensch) _____	37
Abbildung 12:	Partikeltransport an einer isolierten Trachea nach Applikation von 100 μ M TPPO, 1 mM Denatonium und 100 μ M ATP (Maus, Mensch) _____	38
Abbildung 13:	Partikeltransport an einer isolierten Trachea nach Applikation von 100 μ M Chinin und 100 μ M ATP (Maus, Mensch) _____	39
Abbildung 14:	Partikeltransport an einer isolierten Trachea nach Applikation von 20 μ M L-Name, 100 μ M Chinin und 100 μ M ATP (Maus, Mensch) _____	40
Abbildung 15:	Partikeltransport an einer isolierten Trachea nach Applikation von 100 μ M Mecamylamin, 50 μ M Atropin, 100 μ M Chinin und 100 μ M ATP (Maus, Mensch) _____	41
Abbildung 16:	Partikeltransport an einer isolierten Trachea nach Applikation	

	von 1 mM Diphenidol und 100 μ M ATP / 300 μ M Chlorpheniramin und 100 μ M ATP (Maus) _____	42
Abbildung 17:	Partikeltransport an einer isolierten Trachea nach Applikation 10 μ M Ionomycin / 10 μ M Thapsigargin (Maus) _____	42
Abbildung 18:	Exemplarische Darstellung der Integrität der Trachea und des respiratorischen Epithels, Mensch. Methylenblau-Färbung / Hämatoxylin-Eosin-Färbung _____	44
Abbildung 19:	Exemplarische Darstellung von Immunfluoreszenz-Färbung des humanen trachealen Gewebes von drei verschiedenen Körperspendern _____	45

7. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACh	Acetylcholin
AG	Arbeitsgruppe
ASL	Airway surface liquid
ATP	Adenosintriphosphat
Atr	Atropin
BC	Bürstenzellen
BSA	Bovine Serum Albumin
[Ca ²⁺] _e	Extrazelluläre Calciumkonzentration
[Ca ²⁺] _i	Intrazelluläre Calciumkonzentration
CBF	Zilienschlagfrequenz
ChAT	Cholinacetyltransferase
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
Chin	Chinin
Chlo	Chlorpheniramin
Den	Denatonium
Dip	Diphenidol
eNOS	Endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
Iono	Ionomycin
mACh	Muskarinischer Acetylcholinrezeptoren
MC	Mukoziliäre Clearance
Mec	Mecamylamin

Abkürzungsverzeichnis

MEM	Minimal essential Medium
nACh	Nikotinische Acetylcholinrezeptoren
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
ns	Nicht signifikant
PA	Primärantikörper
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PFA	Paraformaldehyd
PP	Phosphat Puffer
PTC	Phenylthiocarbamid
PTP	Partikeltransport Puffer
PTS	Partikeltransportgeschwindigkeit
RBD	Rapid Bone Decalcifier
SA	Sekundärantikörper
SCC	Solitäre chemosensorische Zellen
Tab.	Tabelle
TAS2-R	Taste receptor type 2
Thaps	Thapsigargin
TPPO	Triphenylphosphanoxid
TRPM5	Transienter Rezeptorpotenzial-Kationenkanal Unterfamilie M Mitglied 5

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Reaktionsprofile von 25 humanen hTAS2R, die mit Bitterstoffen stimuliert wurden _____	7
Tabelle 2:	Reaktionsprofile von 21 murinen mTAS2R, die mit Bitterstoffen stimuliert wurden _____	7
Tabelle 3:	Liste der verwendeten Stoffe _____	14
Tabelle 4:	Liste der verwendeten Geräte _____	16
Tabelle 5:	Liste der verwendeten Labormaterialien _____	17
Tabelle 6:	Liste der in den Versuchen verwendeten Stimuli und Inhibitoren _____	19
Tabelle 7:	Liste der verwendeten Stimuli und Inhibitoren mit den jeweiligen Konzentrationen _____	21
Tabelle 8:	Genutzte Primär- und Sekundärantikörper _____	32

9. Literaturverzeichnis

1. Schünke, M. u.a. (2022). *PROMETHEUS LernAtlas der Anatomie – Innere Organe* (6. Aufl.). Georg Thieme Verlag KG.

2. Mieczkowski B, Seavey BF. Anatomy, Head and Neck, Trachea. 2023 Aug 7. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan–. PMID: 28846296.

3. Brand-Saberi BEM, Schäfer T. Trachea: anatomy and physiology. Thorac Surg Clin. 2014 Feb;24(1):1-5. doi: 10.1016/j.thorsurg.2013.09.004. Epub 2013 Nov 9. PMID: 24295654.

4. Prometheus LernAtlas der. Anatomie: Kopf, Hals und Neuroanatomie, 3. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2012. [25] Schünke M, Schulte E, Schumacher U. Prometheus.

5. Furlow PW, Mathisen DJ. Surgical anatomy of the trachea. Ann Cardiothorac Surg. 2018 Mar;7(2):255-260. doi: 10.21037/acs.2018.03.01. PMID: 29707503; PMCID: PMC5900092.

6. Minnich DJ, Mathisen DJ. Anatomy of the trachea, carina, and bronchi. Thorac Surg Clin. 2007 Nov;17(4):571-85. doi: 10.1016/j.thorsurg.2006.12.006. PMID: 18271170.

7. Karaman E, Isildak H, Mercan H, Hacizade Y, Cansiz H. Invasion of the recurrent laryngeal nerve by tracheal tumor: an unusual presentation with coincidental huge multinodular goiter. J Craniofac Surg. 2008 Nov;19(6):1707-10. doi: 10.1097/SCS.0b013e31818ac28e. PMID: 19098590.

8. Wallace S, McGrath BA. Laryngeal complications after tracheal intubation and tracheostomy. BJA Educ. 2021 Jul;21(7):250-257. doi: 10.1016/j.bjae.2021.02.005. Epub 2021 Apr 21. PMID: 34178381; PMCID: PMC8212164.

9. Robbins RA, Rennart SI (1997) Biology of airway epithelial cells. In: Crystal RG, West JB, Weibel ER (eds) The lung. Scientific foundations, vol 1. Lippincott-Raven, Philadelphia, pp 445–447

10. Lüllmann-Rauch, R. (2019). *Histologie* (7th ed.). Thieme.

11. Deprez M, Zaragosi LE, Truchi M, Becavin C, Ruiz García S, Arguel MJ, Plaisant M, Magnone V, Lebrigand K, Abelanet S, Brau F, Paquet A, Pe'er D, Marquette CH, Leroy S, Barbry P. A Single-Cell Atlas of the Human Healthy Airways. *Am J Respir Crit Care Med*. 2020 Dec 15;202(12):1636-1645. doi: 10.1164/rccm.201911-2199OC. PMID: 32726565.

12. Ohkimoto K, Mouri M, Amatsu M, Teraoka M. [Histological study of the tracheal adventitia, perichondrium and annular ligament]. *Nihon Jibiinkoka Gakkai Kaiho*. 1997 Nov;100(11):1394-400. Japanese. doi: 10.3950/jibiinkoka.100.1394. PMID: 9423323.

13. Balmelli C, Demotz S, Acha-Orbea H, De Grandi P, Nardelli-Haeffliger D. Trachea, lung, and tracheobronchial lymph nodes are the major sites where antigen-presenting cells are detected after nasal vaccination of mice with human papillomavirus type 16 virus-like particles. *J Virol*. 2002 Dec;76(24):12596-602. doi: 10.1128/jvi.76.24.12596-12602.2002. PMID: 12438585; PMCID: PMC136716.

14. Tatar M, Hanacek J, Widdicombe J. The expiration reflex from the trachea and bronchi. *Eur Respir J*. 2008 Feb;31(2):385-90. doi: 10.1183/09031936.00063507. Epub 2007 Oct 24. PMID: 17959638.

15. Hollenhorst MI, Nandigama R, Evers SB, Gamayun I, Abdel Wadood N, Salah A, Pieper M, Wyatt A, Stukalov A, Gebhardt A, Nadolni W, Burow W, Herr C, Beisswenger C, Kusumakshi S, Ectors F, Kichko TI, Hübner L, Reeh P, Munder A, Wienhold SM, Witzenrath M, Bals R, Flockerzi V, Gudermann T, Bischoff M, Lipp P, Zierler S, Chubanov V, Pichlmair A, König P, Boehm U, Krasteva-Christ G. Bitter taste signaling in tracheal epithelial brush cells elicits innate immune responses to bacterial infection. *J Clin Invest*. 2022 Jul 1;132(13):e150951. doi: 10.1172/JCI150951. PMID: 35503420; PMCID: PMC9246383.

16. Hollenhorst MI, Jurastow I, Nandigama R, Appenzeller S, Li L, Vogel J, Wiederhold S, Althaus M, Empting M, Altmüller J, Hirsch AKH, Flockerzi V, Canning BJ, Saliba AE, Krasteva-Christ G. Tracheal brush cells release acetylcholine in response to bitter tastants for paracrine and autocrine signaling. *FASEB J*. 2020 Jan;34(1):316-332. doi: 10.1096/fj.201901314RR. Epub 2019 Nov 22. PMID: 31914675.

17. Krasteva G, Canning BJ, Hartmann P, Veres TZ, Papadakis T, Mühlfeld C, Schliecker K, Tallini YN, Braun A, Hackstein H, Baal N, Weihe E, Schütz B, Kotlikoff M, Ibanez-Tallon I, Kummer W. Cholinergic chemosensory cells in the trachea regulate breathing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Jun 7;108(23):9478-83. doi: 10.1073/pnas.1019418108. Epub 2011 May 23. PMID: 21606356; PMCID: PMC3111311.

18. 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. doi: 10.1016/j.immuni.2020.03.005. PMID: 32294408.

19. Rhodin J, Dalhmn T. Electron microscopy of the tracheal ciliated mucosa in rat. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*. 1956;44(4):345-412. doi: 10.1007/BF00345847. PMID: 13353477.

20. Wei W, Zhang W, Wu S, Duan W, Wang Z. Advances in tuft cells, a chemosensory cell in sequential diseases of the pancreas. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2023 Jul;1878(4):188911. doi: 10.1016/j.bbcan.2023.188911. Epub 2023 May 12. PMID: 37182665.

21. Dobransky T, Rylett RJ. Functional regulation of choline acetyltransferase by phosphorylation. *Neurochem Res*. 2003 Apr;28(3-4):537-42. doi: 10.1023/a:1022873323561. PMID: 12675142.

22. Lee RJ, Xiong G, Kofonow JM, Chen B, Lysenko A, Jiang P, Abraham V, Doghramji L, Adappa ND, Palmer JN, Kennedy DW, Beauchamp GK, Doulias PT, Ischiropoulos H, Kreindler JL, Reed DR, Cohen NA. T2R38 taste receptor polymorphisms underlie susceptibility to upper respiratory infection. *J Clin Invest*. 2012 Nov;122(11):4145-59. doi: 10.1172/JCI64240. Epub 2012 Oct 8. PMID: 23041624; PMCID: PMC3484455.

23. Lee RJ, Kofonow JM, Rosen PL, Siebert AP, Chen B, Doghramji L, Xiong G, Adappa ND, Palmer JN, Kennedy DW, Kreindler JL, Margolskee RF, Cohen NA. Bitter and sweet taste receptors regulate human upper respiratory innate immunity. *J Clin Invest*. 2014 Mar;124(3):1393-405. doi: 10.1172/JCI72094. Epub 2014 Feb 17. PMID: 24531552;

PMCID:

PMC3934184.

24. Carey RM, Hariri BM, Adappa ND, Palmer JN, Lee RJ. HSP90 Modulates T2R Bitter Taste Receptor Nitric Oxide Production and Innate Immune Responses in Human Airway Epithelial Cells and Macrophages. *Cells*. 2022 Apr 27;11(9):1478. doi: 10.3390/cells11091478. PMID: 35563784; PMCID: PMC9101439.
25. Descamps-Solà M, Vilalta A, Jalsevac F, Blay MT, Rodríguez-Gallego E, Pinent M, Beltrán-Debón R, Terra X, Ardévol A. Bitter taste receptors along the gastrointestinal tract: comparison between humans and rodents. *Front Nutr*. 2023 Aug 30;10:1215889. doi: 10.3389/fnut.2023.1215889. PMID: 37712001; PMCID: PMC10498470.
26. Devillier P, Naline E, Grassin-Delyle S. The pharmacology of bitter taste receptors and their role in human airways. *Pharmacol Ther*. 2015 Nov;155:11-21. doi: 10.1016/j.pharmthera.2015.08.001. Epub 2015 Aug 10. PMID: 26272040.
27. Lossow K, Hübner S, Roudnitzky N, Slack JP, Pollastro F, Behrens M, Meyerhof W. Comprehensive Analysis of Mouse Bitter Taste Receptors Reveals Different Molecular Receptive Ranges for Orthologous Receptors in Mice and Humans. *J Biol Chem*. 2016 Jul 15;291(29):15358-77. doi: 10.1074/jbc.M116.718544. Epub 2016 May 20. PMID: 27226572; PMCID: PMC4946946.
28. Shaik FA, Singh N, Arakawa M, Duan K, Bhullar RP, Chelikani P. Bitter taste receptors: Extraoral roles in pathophysiology. *Int J Biochem Cell Biol*. 2016 Aug;77(Pt B):197-204. doi: 10.1016/j.biocel.2016.03.011. Epub 2016 Mar 23. PMID: 27032752.
29. Meyerhof W, Batram C, Kuhn C, Brockhoff A, Chudoba E, Bufe B, Appendino G, Behrens M. The molecular receptive ranges of human TAS2R bitter taste receptors. *Chem Senses*. 2010 Feb;35(2):157-70. doi: 10.1093/chemse/bjp092. Epub 2009 Dec 18. PMID: 20022913.
30. Hollenhorst MI, Kumar P, Zimmer M, Salah A, Maxeiner S, Elhawy MI, Evers SB, Flockerzi V, Gudermann T, Chubanov V, Boehm U, Krasteva-Christ G. Taste Receptor Activation in Tracheal Brush Cells by Denatonium Modulates ENaC Channels via Ca²⁺, cAMP and ACh. *Cells*. 2022 Aug 4;11(15):2411. doi: 10.3390/cells11152411. PMID: 35954259; PMCID: PMC9367940.

31. Dotson CD, Vigues S, Steinle NI, Munger SD. T1R and T2R receptors: the modulation of incretin hormones and potential targets for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Curr Opin Investig Drugs*. 2010 Apr;11(4):447-54. PMID: 20336593; PMCID: PMC4535793.

32. Palmer RK, Atwal K, Bakaj I, Carlucci-Derbyshire S, Buber MT, Cerne R, Cortés RY, Devantier HR, Jorgensen V, Pawlyk A, Lee SP, Sproun DG, Zhang Z, Bryant R. Triphenylphosphine oxide is a potent and selective inhibitor of the transient receptor potential melastatin-5 ion channel. *Assay Drug Dev Technol*. 2010 Dec;8(6):703-13. doi: 10.1089/adt.2010.0334. PMID: 21158685.

33. Yamashita J, Ohmoto M, Yamaguchi T, Matsumoto I, Hirota J. Skn-1a/Pou2f3 functions as a master regulator to generate Trpm5-expressing chemosensory cells in mice. *PLoS One*. 2017 Dec 7;12(12):e0189340. doi: 10.1371/journal.pone.0189340. PMID: 29216297; PMCID: PMC5720759.

34. Damak S, Rong M, Yasumatsu K, Kokrashvili Z, Pérez CA, Shigemura N, Yoshida R, Mosinger B Jr, Glendinning JJ, Ninomiya Y, Margolskee RF. Trpm5 null mice respond to bitter, sweet, and umami compounds. *Chem Senses*. 2006 Mar;31(3):253-64. doi: 10.1093/chemse/bjj027. Epub 2006 Jan 25. PMID: 16436689.

35. Brixel LR, Monteilh-Zoller MK, Ingenbrandt CS, Fleig A, Penner R, Enklaar T, Zabel BU, Prawitt D. TRPM5 regulates glucose-stimulated insulin secretion. *Pflugers Arch*. 2010 Jun;460(1):69-76. doi: 10.1007/s00424-010-0835-z. PMID: 20393858; PMCID: PMC5663632.

36. Afzelius BA. Cilia-related diseases. *J Pathol*. 2004 Nov;204(4):470-7. doi: 10.1002/path.1652. PMID: 15495266; PMCID: PMC7167937.

37. Bezençon C, Fürholz A, Raymond F, Mansourian R, Métairon S, Le Coutre J, Damak S. Murine intestinal cells expressing Trpm5 are mostly brush cells and express markers of neuronal and inflammatory cells. *J Comp Neurol*. 2008 Aug 10;509(5):514-25. doi: 10.1002/cne.21768. PMID: 18537122.

38. Taruno A. ATP Release Channels. *Int J Mol Sci*. 2018 Mar 11;19(3):808. doi: 10.3390/ijms19030808. PMID: 29534490; PMCID: PMC5877669.

39. Patel NN, Workman AD, Cohen NA. Role of Taste Receptors as Sentinels of Innate Immunity in the Upper Airway. *J Pathog.* 2018 Oct 1;2018:9541987. doi: 10.1155/2018/9541987. PMID: 30363975; PMCID: PMC6188595.

40. Finger TE, Böttger B, Hansen A, Anderson KT, Alimohammadi H, Silver WL. Solitary chemoreceptor cells in the nasal cavity serve as sentinels of respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Jul 22;100(15):8981-6. doi: 10.1073/pnas.1531172100. Epub 2003 Jul 11. PMID: 12857948; PMCID: PMC166424.

41. Sam C, Bordoni B. Physiology, Acetylcholine. 2023 Apr 10. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan–. PMID: 32491757.

42. Hasselmo ME. The role of acetylcholine in learning and memory. *Curr Opin Neurobiol.* 2006 Dec;16(6):710-5. doi: 10.1016/j.conb.2006.09.002. Epub 2006 Sep 29. PMID: 17011181; PMCID: PMC2659740.

43. Picciotto MR, Higley MJ, Mineur YS. Acetylcholine as a neuromodulator: cholinergic signaling shapes nervous system function and behavior. *Neuron.* 2012 Oct 4;76(1):116-29. doi: 10.1016/j.neuron.2012.08.036. PMID: 23040810; PMCID: PMC3466476.

44. Do HB, Ohbuchi T, Yokoyama M, Kitamura T, Wakasugi T, Ohkubo JI, Suzuki H. Decreased ciliary beat responsiveness to acetylcholine in the nasal polyp epithelium. *Clin Otolaryngol.* 2019 May;44(3):356-365. doi: 10.1111/coa.13312. Epub 2019 Mar 18. PMID: 30762948.

45. Macklin KD, Maus AD, Pereira EF, Albuquerque EX, Conti-Fine BM. Human vascular endothelial cells express functional nicotinic acetylcholine receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998 Oct;287(1):435-9. PMID: 9765366.

46. Kummer W, Lips KS, Pfeil U. The epithelial cholinergic system of the airways. *Histochem Cell Biol.* 2008 Aug;130(2):219-34. doi: 10.1007/s00418-008-0455-2. Epub 2008 Jun 20. PMID: 18566825; PMCID: PMC2491704.

47. 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. *Int Immunopharmacol.* 2020 Jul;84:106496. doi:

- 10.1016/j.intimp.2020.106496. Epub 2020 Apr 15. PMID: 32304995.
48. Braiman A, Priel Z. Efficient mucociliary transport relies on efficient regulation of ciliary beating. *Respir Physiol Neurobiol.* 2008 Nov 30;163(1-3):202-7. doi: 10.1016/j.resp.2008.05.010. Epub 2008 May 22. PMID: 18586580.
49. Roger Ecker ,Bioelectric Control of Ciliary Activity. *Science* **176**,473-481(1972). DOI: 10.1126/science.176.4034.473
50. 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. doi: 10.1016/j.immuni.2020.03.005. PMID: 32294408.
51. Saunders CJ, Christensen M, Finger TE, Tizzano M. Cholinergic neurotransmission links solitary chemosensory cells to nasal inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 Apr 22;111(16):6075-80. doi: 10.1073/pnas.1402251111. Epub 2014 Apr 7. PMID: 24711432; PMCID: PMC4000837.
52. Trang A, Khandhar PB. Physiology, Acetylcholinesterase. 2023 Jan 19. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan–. PMID: 30969557.
53. Massoulié J, Pezzementi L, Bon S, Krejci E, Vallette FM. Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Prog Neurobiol.* 1993 Jul;41(1):31-91. doi: 10.1016/0301-0082(93)90040-y. PMID: 8321908.
54. Rotella FM, Olsson K, Vig V, Yenkov I, Pagirsky J, Kohen I, Aminov A, Dindyal T, Bodnar RJ. Muscarinic and nicotinic cholinergic receptor antagonists differentially mediate acquisition of fructose-conditioned flavor preference and quinine-conditioned flavor avoidance in rats. *Neurobiol Learn Mem.* 2015 Sep;123:239-49. doi: 10.1016/j.nlm.2015.07.004. Epub 2015 Jul 16. PMID: 26188277.
55. Dani JA. Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor Structure and Function and Response to Nicotine. *Int Rev Neurobiol.* 2015;124:3-19. doi:

- 10.1016/bs.irn.2015.07.001. Epub 2015 Aug 21. PMID: 26472524; PMCID: PMC4795468.
56. Dani JA. Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor Structure and Function and Response to Nicotine. *Int Rev Neurobiol.* 2015;124:3-19. doi: 10.1016/bs.irn.2015.07.001. Epub 2015 Aug 21. PMID: 26472524; PMCID: PMC4795468.
57. Hurst R, Rollema H, Bertrand D. Nicotinic acetylcholine receptors: from basic science to therapeutics. *Pharmacol Ther.* 2013 Jan;137(1):22-54. doi: 10.1016/j.pharmthera.2012.08.012. Epub 2012 Aug 25. PMID: 22925690.
58. Dani JA. Overview of nicotinic receptors and their roles in the central nervous system. *Biol Psychiatry.* 2001 Feb 1;49(3):166-74. doi: 10.1016/s0006-3223(00)01011-8. PMID: 11230867.
59. Wittenberg RE, Wolfman SL, De Biasi M, Dani JA. Nicotinic acetylcholine receptors and nicotine addiction: A brief introduction. *Neuropharmacology.* 2020 Oct 15;177:108256. doi: 10.1016/j.neuropharm.2020.108256. Epub 2020 Jul 29. PMID: 32738308; PMCID: PMC7554201.
60. Kudlak M, Tadi P. Physiology, Muscarinic Receptor. 2023 Aug 8. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan–. PMID: 32310369.
61. Jiang S, Li Y, Zhang C, Zhao Y, Bu G, Xu H, Zhang YW. M1 muscarinic acetylcholine receptor in Alzheimer's disease. *Neurosci Bull.* 2014 Apr;30(2):295-307. doi: 10.1007/s12264-013-1406-z. Epub 2014 Mar 3. PMID: 24590577; PMCID: PMC5562652.
62. Karakiulakis G, Roth M. Muscarinic receptors and their antagonists in COPD: anti-inflammatory and antiremodeling effects. *Mediators Inflamm.* 2012;2012:409580. doi: 10.1155/2012/409580. Epub 2012 Nov 24. PMID: 23226927; PMCID: PMC3512336.
63. Bhattacharjee AK, Pomponio JW, Evans SA, Pervitsky D, Gordon RK. Discovery of subtype selective muscarinic receptor antagonists as alternatives to atropine using in silico pharmacophore modeling and virtual screening methods. *Bioorg Med Chem.* 2013 May 1;21(9):2651-62. doi: 10.1016/j.bmc.2013.01.072. Epub 2013 Feb 11. PMID:

23523385.

64. Yasuda M, Inui TA, Hirano S, Asano S, Okazaki T, Inui T, Marunaka Y, Nakahari T. Intracellular Cl⁻ Regulation of Ciliary Beating in Ciliated Human Nasal Epithelial Cells: Frequency and Distance of Ciliary Beating Observed by High-Speed Video Microscopy. *Int J Mol Sci*. 2020 Jun 5;21(11):4052. doi: 10.3390/ijms21114052. PMID: 32517062; PMCID: PMC7312665.

65. Wanner A. Mucociliary clearance in the trachea. *Clin Chest Med*. 1986 Jun;7(2):247-58. PMID: 3522072.

66. Do BH, Ohbuchi T, Wakasugi T, Koizumi H, Yokoyama M, Hohchi N, Suzuki H. Acetylcholine-induced Ciliary Beat of the Human Nasal Mucosa Is Regulated by the Pannexin-1 Channel and Purinergic P2X Receptor. *Am J Rhinol Allergy*. 2018 Jul;32(4):217-227. doi: 10.1177/1945892418770292. Epub 2018 Apr 20. PMID: 29676177.

67. Lai Y, Dilidaer D, Chen B, Xu G, Shi J, Lee RJ, Cohen NA. In vitro studies of a distillate of rectified essential oils on sinonasal components of mucociliary clearance. *Am J Rhinol Allergy*. 2014 May-Jun;28(3):244-8. doi: 10.2500/ajra.2014.28.4036. PMID: 24980236.

68. Mikhailik A, Michurina TV, Dikranian K, Hearn S, Maxakov VI, Siller SS, Takemaru KI, Enikolopov G, Peunova N. nNOS regulates ciliated cell polarity, ciliary beat frequency, and directional flow in mouse trachea. *Life Sci Alliance*. 2021 Mar 2;4(5):e202000981. doi: 10.26508/lsa.202000981. PMID: 33653689; PMCID: PMC8008965.

69. Larsen R. Atemtherapie. *Anästhesie und Intensivmedizin für die Fachpflege*. 2016 Jun 14:716–28. German. doi: 10.1007/978-3-662-50444-4_54. PMCID: PMC7531291.

70. Wittig T. Mukoziliäre Clearance bei COVID-19-Erkrankungen : Ein unterschätztes Gefahrengebiet in der Frühphase? [Mucociliary clearance in COVID-19 - an underestimated danger area in early phase of disease?]. *MMW Fortschr Med*. 2021 Sep;163(Suppl 5):21-27. German. doi: 10.1007/s15006-021-0189-9. PMID: 34383284; PMCID: PMC8359637.

71. Do BH, Nguyen TN, Baba R, Ohbuchi T, Ohkubo JI, Kitamura T, Wakasugi T, Morimoto H, Suzuki H. Calmodulin and protein kinases A/G mediate ciliary beat response in the

- human nasal epithelium. *Int Forum Allergy Rhinol.* 2019 Nov;9(11):1352-1359. doi: 10.1002/alr.22442. Epub 2019 Oct 1. PMID: 31574592.
72. Chatterjee M, van Putten JPM, Strijbis K. Defensive Properties of Mucin Glycoproteins during Respiratory Infections-Relevance for SARS-CoV-2. *mBio.* 2020 Nov 12;11(6):e02374-20. doi: 10.1128/mBio.02374-20. PMID: 33184103; PMCID: PMC7663010.
73. Cone RA. Barrier properties of mucus. *Adv Drug Deliv Rev.* 2009 Feb 27;61(2):75-85. doi: 10.1016/j.addr.2008.09.008. Epub 2008 Dec 16. PMID: 19135107.
74. Köhler D. Physiologie und Pathophysiologie des Hustens [Physiology and pathophysiology of cough]. *Pneumologie.* 2008 Mar;62 Suppl 1:S14-7. German. doi: 10.1055/s-2007-959214. PMID: 18317976.
75. Munkholm M, Mortensen J. Mucociliary clearance: pathophysiological aspects. *Clin Physiol Funct Imaging.* 2014 May;34(3):171-7. doi: 10.1111/cpf.12085. Epub 2013 Sep 30. PMID: 24119105.
76. Kardos P, Berck H, Fuchs KH, Gillissen A, Klimek L, Morr H, Pfeiffer-Kascha D, Schultze-Werninghaus G, Sitter H, Voshaar T, Worth H; German Respiratory Society for diagnosis and treatment of adults suffering from acute or chronic cough. Guidelines of the German Respiratory Society for diagnosis and treatment of adults suffering from acute or chronic cough. *Pneumologie.* 2010 Nov;64(11):701-11. doi: 10.1055/s-0030-1255526. Epub 2010 Aug 6. PMID: 20694945.
77. Garcia X, Stein F. Nitric oxide. *Semin Pediatr Infect Dis.* 2006 Apr;17(2):55-7. doi: 10.1053/j.spid.2006.04.002. PMID: 16822466.
78. Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J.* 2012 Apr;33(7):829-37, 837a-837d. doi: 10.1093/eurheartj/ehr304. Epub 2011 Sep 1. PMID: 21890489; PMCID: PMC3345541.
79. Paul V, Ekambaram P. Involvement of nitric oxide in learning & memory processes. *Indian J Med Res.* 2011 May;133(5):471-8. PMID: 21623030; PMCID: PMC3121276.

80. Alberty J, August C, Stoll W, Rudack C. The effect of endogenous nitric oxide on cholinergic ciliary stimulation of human nasal mucosa. *Laryngoscope*. 2004 Sep;114(9):1642-7. doi: 10.1097/00005537-200409000-00026. PMID: 15475797.

81. Bruckdorfer R. The basics about nitric oxide. *Mol Aspects Med*. 2005 Feb-Apr;26(1-2):3-31. doi: 10.1016/j.mam.2004.09.002. Epub 2005 Jan 24. PMID: 15722113.

82. Kopincová J, Púzserová A, Bernátová I. L-NAME in the cardiovascular system - nitric oxide synthase activator? *Pharmacol Rep*. 2012;64(3):511-20. doi: 10.1016/s1734-1140(12)70846-0. PMID: 22814004.

83. Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J*. 2012 Apr;33(7):829-37, 837a-837d. doi: 10.1093/eurheartj/ehr304. Epub 2011 Sep 1. PMID: 21890489; PMCID: PMC3345541.

84. Hoos MD, Vitek MP, Ridnour LA, Wilson J, Jansen M, Everhart A, Wink DA, Colton CA. The impact of human and mouse differences in NOS2 gene expression on the brain's redox and immune environment. *Mol Neurodegener*. 2014 Nov 17;9:50. doi: 10.1186/1750-1326-9-50. PMID: 25403885; PMCID: PMC4247207.

85. Blanco EE, Pinge MC, Andrade Neto OA, Pessoa NG. Effects of nitric oxide in mucociliary transport. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2009 Nov-Dec;75(6):866-71. doi: 10.1016/s1808-8694(15)30551-6. PMID: 20209289; PMCID: PMC9446053.

86. Imada M, Nonaka S, Kobayashi Y, Iwamoto J. Functional roles of nasal nitric oxide in nasal patency and mucociliary function. *Acta Otolaryngol*. 2002 Jul;122(5):513-9. doi: 10.1080/00016480260092327. PMID: 12206261.

87. Upadhyaya JD, Chakraborty R, Shaik FA, Jaggupilli A, Bhullar RP, Chelikani P. The Pharmacochaperone Activity of Quinine on Bitter Taste Receptors. *PLoS One*. 2016 May 25;11(5):e0156347. doi: 10.1371/journal.pone.0156347. PMID: 27223611; PMCID: PMC4880206.

88. Achan J, Talisuna AO, Erhart A, Yeka A, Tibenderana JK, Baliraine FN, Rosenthal PJ, D'Alessandro U. Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: role in the treatment of malaria. *Malar J*. 2011 May 24;10:144. doi: 10.1186/1475-2875-10-144. PMID:

-
- 21609473; PMCID: PMC3121651.
89. Rizvi SAA, Ferrer G, Khawaja UA, Sanchez-Gonzalez MA. Chlorpheniramine, an Old Drug with New Potential Clinical Applications: A Comprehensive Review of the Literature. *Curr Rev Clin Exp Pharmacol.* 2024;19(2):137-145. doi: 10.2174/2772432817666220601162006. PMID: 35652393.
90. Jelvehgari M, Barghi L, Barghi F. Preparation of Chlorpheniramine Maleate-loaded Alginate/Chitosan Particulate Systems by the Ionic Gelation Method for Taste Masking. *Jundishapur J Nat Pharm Prod.* 2014 Feb;9(1):39-48. doi: 10.17795/jjnpp-12530. Epub 2014 Feb 20. PMID: 24644438; PMCID: PMC3957142.
91. Civantos AM, Maina IW, Arnold M, Lin C, Stevens EM, Tan LH, Gleeson PK, Colquitt LR, Cowart BJ, Bosso JV, Palmer JN, Adappa ND, Kohanski MA, Reed DR, Cohen NA. Denatonium benzoate bitter taste perception in chronic rhinosinusitis subgroups. *Int Forum Allergy Rhinol.* 2021 Jun;11(6):967-975. doi: 10.1002/alr.22687. Epub 2020 Sep 3. PMID: 32885614.
92. Straub SG, Mulvaney-Musa J, Yajima H, Weiland GA, Sharp GW. Stimulation of insulin secretion by denatonium, one of the most bitter-tasting substances known. *Diabetes.* 2003 Feb;52(2):356-64. doi: 10.2337/diabetes.52.2.356. PMID: 12540608.
93. Yang CC, Deng JF. Clinical experience in acute overdosage of diphenidol. *J Toxicol Clin Toxicol.* 1998;36(1-2):33-9. doi: 10.3109/15563659809162581. PMID: 9541039.
94. Wölfle U, Elsholz FA, Kersten A, Haarhaus B, Müller WE, Schempp CM. Expression and functional activity of the bitter taste receptors TAS2R1 and TAS2R38 in human keratinocytes. *Skin Pharmacol Physiol.* 2015;28(3):137-46. doi: 10.1159/000367631. Epub 2015 Jan 7. PMID: 25573083.
95. Liu WC, Slusarchyk DS, Astle G, Trejo WH, Brown WE, Meyers E. Ionomycin, a new polyether antibiotic. *J Antibiot (Tokyo).* 1978 Sep;31(9):815-9. doi: 10.7164/antibiotics.31.815. PMID: 711623.
96. Liu C, Hermann TE. Characterization of ionomycin as a calcium ionophore. *J Biol Chem.* 1978 Sep 10;253(17):5892-4. PMID: 28319.

97. Vazquez A, Auffredou MT, Chaouchi N, Taieb J, Sharma S, Galanaud P, Leca G. Differential inhibition of interleukin 2- and interleukin 4-mediated human B cell proliferation by ionomycin: a possible regulatory role for apoptosis. *Eur J Immunol.* 1991 Oct;21(10):2311-6. doi: 10.1002/eji.1830211004. PMID: 1915547.

98. Andersen TB, López CQ, Manczak T, Martinez K, Simonsen HT. Thapsigargin--from Thapsia L. to mipsagargin. *Molecules.* 2015 Apr 8;20(4):6113-27. doi: 10.3390/molecules20046113. PMID: 25856061; PMCID: PMC6272310.

99. Lindner P, Christensen SB, Nissen P, Møller JV, Engedal N. Cell death induced by the ER stressor thapsigargin involves death receptor 5, a non-autophagic function of MAP1LC3B, and distinct contributions from unfolded protein response components. *Cell Commun Signal.* 2020 Jan 27;18(1):12. doi: 10.1186/s12964-019-0499-z. PMID: 31987044; PMCID: PMC6986015.

100. Ma W, Korngreen A, Weil S, Cohen EB, Priel A, Kuzin L, Silberberg SD. Pore properties and pharmacological features of the P2X receptor channel in airway ciliated cells. *J Physiol.* 2006 Mar 15;571(Pt 3):503-17. doi: 10.1113/jphysiol.2005.103408. Epub 2006 Jan 19. PMID: 16423852; PMCID: PMC1805806.

101. Morse DM, Smullen JL, Davis CW. Differential effects of UTP, ATP, and adenosine on ciliary activity of human nasal epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001 Jun;280(6):C1485-97. doi: 10.1152/ajpcell.2001.280.6.C1485. PMID: 11350744.

102. Koizumi H, Ikezaki S, Ohbuchi T, Do BH, Hohchi N, Kawaguchi R, Kitamura T, Suzuki H. Acetylcholine-induced ex vivo ATP release from the human nasal mucosa. *Auris Nasus Larynx.* 2017 Aug;44(4):422-427. doi: 10.1016/j.anl.2016.09.003. Epub 2016 Sep 28. PMID: 27692399.

103. Palmer RK, Atwal K, Bakaj I, Carlucci-Derbyshire S, Buber MT, Cerne R, Cortés RY, Devantier HR, Jorgensen V, Pawlyk A, Lee SP, Sproun DG, Zhang Z, Bryant R. Triphenylphosphine oxide is a potent and selective inhibitor of the transient receptor potential melastatin-5 ion channel. *Assay Drug Dev Technol.* 2010 Dec;8(6):703-13. doi: 10.1089/adt.2010.0334. PMID: 21158685.

104. Pérez CA, Huang L, Rong M, Kozak JA, Preuss AK, Zhang H, Max M, Margolskee RF. A transient receptor potential channel expressed in taste receptor cells. *Nat Neurosci.*

-
- 2002 Nov;5(11):1169-76. doi: 10.1038/nn952. PMID: 12368808.
105. GraphPad Software. (o.D.). Funktionen. Abgerufen am 28. März 2024, von <https://www.graphpad.com/features>
106. Andrade C. The *P* Value and Statistical Significance: Misunderstandings, Explanations, Challenges, and Alternatives. *Indian J Psychol Med.* 2019 May-Jun;41(3):210-215. doi: 10.4103/IJPSYM.IJPSYM_193_19. PMID: 31142921; PMCID: PMC6532382.
107. Feldman AT, Wolfe D. Tissue processing and hematoxylin and eosin staining. *Methods Mol Biol.* 2014;1180:31-43. doi: 10.1007/978-1-4939-1050-2_3. PMID: 25015141.
108. Gerbe F, Brulin B, Makrini L, Legraverend C, Jay P. DCAMKL-1 expression identifies Tuft cells rather than stem cells in the adult mouse intestinal epithelium. *Gastroenterology.* 2009 Dec;137(6):2179-80; author reply 2180-1. doi: 10.1053/j.gastro.2009.06.072. Epub 2009 Oct 29. PMID: 19879217.
109. Nguyen B, Ciuba MA, Kozlov AG, Levitus M, Lohman TM. Protein Environment and DNA Orientation Affect Protein-Induced Cy3 Fluorescence Enhancement. *Biophys J.* 2019 Jul 9;117(1):66-73. doi: 10.1016/j.bpj.2019.05.026. Epub 2019 Jun 7. PMID: 31235181; PMCID: PMC6626848.
110. Menacher F, Rubner M, Berndt S, Wagenknecht HA. Thiazole orange and Cy3: improvement of fluorescent DNA probes with use of short range electron transfer. *J Org Chem.* 2008 Jun 6;73(11):4263-6. doi: 10.1021/jo8004793. Epub 2008 Apr 29. PMID: 18442293.
111. Kapuscinski J. DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. *Biotech Histochem.* 1995 Sep;70(5):220-33. doi: 10.3109/10520299509108199. PMID: 8580206.
112. Khan MA, Khan ZA, Charles M, Pratap P, Naeem A, Siddiqui Z, Naqvi N, Srivastava S. Cytokine Storm and Mucus Hypersecretion in COVID-19: Review of Mechanisms. *J Inflamm Res.* 2021 Jan 22;14:175-189. doi: 10.2147/JIR.S271292. PMID: 33519225; PMCID: PMC7838037.

113. Hariri BM, Cohen NA. New insights into upper airway innate immunity. *Am J Rhinol Allergy*. 2016 Sep;30(5):319-23. doi: 10.2500/ajra.2016.30.4360. PMID: 27657896; PMCID: PMC5013235.

114. Montoro DT, Haber AL, Biton M, Vinarsky V, Lin B, Birket SE, Yuan F, Chen S, Leung HM, Villoria J, Rogel N, Burgin G, Tsankov AM, Waghray A, Slyper M, Waldman J, Nguyen L, Dionne D, Rozenblatt-Rosen O, Tata PR, Mou H, Shivaraju M, Bihler H, Mense M, Tearney GJ, Rowe SM, Engelhardt JF, Regev A, Rajagopal J. A revised airway epithelial hierarchy includes CFTR-expressing ionocytes. *Nature*. 2018 Aug;560(7718):319-324. doi: 10.1038/s41586-018-0393-7. Epub 2018 Aug 1. PMID: 30069044; PMCID: PMC6295155.

115. 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, Chubakov V, Gudermann T, Klein J, Bschleipfer T, Kummer W. Bitter triggers acetylcholine release from polymodal urethral chemosensory cells and bladder reflexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Jun 3;111(22):8287-92. doi: 10.1073/pnas.1402436111. Epub 2014 May 19. PMID: 24843119; PMCID: PMC4050540.

116. WATSON JH, BRINKMAN GL. ELECTRON MICROSCOPY OF THE EPITHELIAL CELLS OF NORMAL AND BRONCHITIC HUMAN BRONCHUS. *Am Rev Respir Dis*. 1964 Dec;90:851-66. doi: 10.1164/arrd.1964.90.6.851. PMID: 14233790.

117. Hollenhorst MI, Husnik T, Zylka M, Duda N, Flockerzi V, Tschernig T, Maxeiner S, Krasteva-Christ G. Human airway tuft cells influence the mucociliary clearance through cholinergic signalling. *Respir Res*. 2023 Nov 4;24(1):267. doi: 10.1186/s12931-023-02570-8. PMID: 37925434; PMCID: PMC10625704.

118. Duda N. Charakterisierung von Bürstenzellen in verschiedenen Abschnitten der menschlichen Atemwege. 2021. doi:10.22028/D291-34841

119. Shah AS, Ben-Shahar Y, Moninger TO, Kline JN, Welsh MJ. Motile cilia of human airway epithelia are chemosensory. *Science*. 2009 Aug 28;325(5944):1131-4. doi: 10.1126/science.1173869. Epub 2009 Jul 23. PMID: 19628819; PMCID: PMC2894709.

120. Kumar P, Scholze P, Fronius M, Krasteva-Christ G, Hollenhorst MI. Nicotine stimulates ion transport via metabotropic $\beta 4$ subunit containing nicotinic ACh receptors.

-
- Br J Pharmacol. 2020 Dec;177(24):5595-5608. doi: 10.1111/bph.15270. Epub 2020 Nov 9. PMID: 32959891; PMCID: PMC7707097.
121. Hollenhorst MI, Lips KS, Wolff M, Wess J, Gerbig S, Takats Z, Kummer W, Fronius M. Luminal cholinergic signalling in airway lining fluid: a novel mechanism for activating chloride secretion via Ca^{2+} -dependent Cl^- and K^+ channels. Br J Pharmacol. 2012 Jun;166(4):1388-402. doi: 10.1111/j.1476-5381.2012.01883.x. PMID: 22300281; PMCID: PMC3417454.
122. Perniss A, Boonen B, Tonack S, Thiel M, Poharkar K, Alnouri MW, Keshavarz M, Papadakis T, Wiegand S, Pfeil U, Richter K, Althaus M, Oberwinkler J, Schütz B, Boehm U, Offermanns S, Leinders-Zufall T, Zufall F, Kummer W. A succinate/SUCNR1-brush cell defense program in the tracheal epithelium. Sci Adv. 2023 Aug 2;9(31):eadg8842. doi: 10.1126/sciadv.adg8842. Epub 2023 Aug 2. PMID: 37531421; PMCID: PMC10396310.
123. Hofmann T, Chubanov V, Gudermann T, Montell C. TRPM5 is a voltage-modulated and $\text{Ca}(2+)$ -activated monovalent selective cation channel. Curr Biol. 2003 Jul 1;13(13):1153-8. doi: 10.1016/s0960-9822(03)00431-7. PMID: 12842017.
124. Müller I, Alt P, Rajan S, Schaller L, Geiger F, Dietrich A. Transient Receptor Potential (TRP) Channels in Airway Toxicity and Disease: An Update. Cells. 2022 Sep 17;11(18):2907. doi: 10.3390/cells11182907. PMID: 36139480; PMCID: PMC9497104.
125. Wiegand SB, Traeger L, Nguyen HK, Rouillard KR, Fischbach A, Zadek F, Ichinose F, Schoenfisch MH, Carroll RW, Bloch DB, Zapol WM. Antimicrobial effects of nitric oxide in murine models of Klebsiella pneumonia. Redox Biol. 2021 Feb;39:101826. doi: 10.1016/j.redox.2020.101826. Epub 2020 Dec 11. PMID: 33352464; PMCID: PMC7729265.
126. Kugler P, Höfer D, Mayer B, Drenckhahn D. Nitric oxide synthase and NADP-linked glucose-6-phosphate dehydrogenase are co-localized in brush cells of rat stomach and pancreas. J Histochem Cytochem. 1994 Oct;42(10):1317-21. doi: 10.1177/42.10.7523487. PMID: 7523487.
127. Van der Linde NA, Boomsma F, van den Meiracker AH. Potentiation of L-NAME-induced systemic and renal vasoconstrictor responses by $\alpha 1$ -adrenoceptor

- antagonism. J Hypertens. 2005 May;23(5):1017-24. doi: 10.1097/01.hjh.0000166843.42227.92. PMID: 15834288.
128. Carey RM, Workman AD, Yan CH, Chen B, Adappa ND, Palmer JN, Kennedy DW, Lee RJ, Cohen NA. Sinonasal T2R-mediated nitric oxide production in response to *Bacillus cereus*. Am J Rhinol Allergy. 2017 Jul 1;31(4):211-215. doi: 10.2500/ajra.2017.31.4453. PMID: 28716170; PMCID: PMC5498317.
129. Rodriguez K, Gaston B, Wasman J, Marozkina N. Lessons From Unilateral Loss of Cilia: Early Nasal Nitric Oxide Gas Mixing and the Role of Sinus Patency in Determining Nasal Nitric Oxide. Clin Med Insights Ear Nose Throat. 2017 Dec 13;10:1179550617746361. doi: 10.1177/1179550617746361. PMID: 29276419; PMCID: PMC5734436.
130. Almulhim AM, Menezes RG. Evaluation of Postmortem Changes. 2023 May 1. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan–. PMID: 32119351.
131. Droguett K, Rios M, Carreño DV, Navarrete C, Fuentes C, Villalón M, Barrera NP. An autocrine ATP release mechanism regulates basal ciliary activity in airway epithelium. J Physiol. 2017 Jul 15;595(14):4755-4767. doi: 10.1113/JP273996. Epub 2017 Jun 15. PMID: 28422293; PMCID: PMC5509870.
132. Korngreen A, Ma W, Priel Z, Silberberg SD. Extracellular ATP directly gates a cation-selective channel in rabbit airway ciliated epithelial cells. J Physiol. 1998 May 1;508 (Pt 3)(Pt 3):703-20. doi: 10.1111/j.1469-7793.1998.703bp.x. PMID: 9518727; PMCID: PMC2230903.
133. Koh J, Hogue JA, Sosa JA. A Novel Ex Vivo Method for Visualizing Live-Cell Calcium Response Behavior in Intact Human Tumors. PLoS One. 2016 Aug 18;11(8):e0161134. doi: 10.1371/journal.pone.0161134. PMID: 27537691; PMCID: PMC4990350.
134. Shedge R, Krishan K, Warriar V, Kanchan T. Postmortem Changes. 2023 Jul 24. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan–. PMID: 30969563.

135. Qu Y. [Observation on postmortem tracheal cilia of drowning by scanning electron microscope (SEM)]. *Fa Yi Xue Za Zhi*. 1997;13(3):140, 144, 190 inside back cover. Chinese. PMID: 10375825.

136. Ferguson CC, Richardson JB. A simple technique for the utilization of postmortem tracheal and bronchial tissues for ultrastructural studies. *Hum Pathol*. 1978 Jul;9(4):463-70. doi: 10.1016/s0046-8177(78)80031-8. PMID: 361539.

137. Müller L, Di Benedetto S, Pawelec G. The Immune System and Its Dysregulation with Aging. *Subcell Biochem*. 2019;91:21-43. doi: 10.1007/978-981-13-3681-2_2. PMID: 30888648.

138. Kao CH, Jiang RS, Wang SJ, Yeh SH. Influence of age, gender, and ethnicity on nasal mucociliary clearance function. *Clin Nucl Med*. 1994 Sep;19(9):813-6. doi: 10.1097/00003072-199409000-00015. PMID: 7982319.

139. Khan MA, Khan ZA, Charles M, Pratap P, Naeem A, Siddiqui Z, Naqvi N, Srivastava S. Cytokine Storm and Mucus Hypersecretion in COVID-19: Review of Mechanisms. *J Inflamm Res*. 2021 Jan 22;14:175-189. doi: 10.2147/JIR.S271292. PMID: 33519225; PMCID: PMC7838037.

140. De Boeck K. Cystic fibrosis in the year 2020: A disease with a new face. *Acta Paediatr*. 2020 May;109(5):893-899. doi: 10.1111/apa.15155. Epub 2020 Jan 22. PMID: 31899933.

141. Olm MA, Caldini EG, Mauad T. Diagnosis of primary ciliary dyskinesia. *J Bras Pneumol*. 2015 May-Jun;41(3):251-63. doi: 10.1590/S1806-37132015000004447. PMID: 26176524; PMCID: PMC4541762.

142. Talbot HK, Falsey AR. The diagnosis of viral respiratory disease in older adults. *Clin Infect Dis*. 2010 Mar 1;50(5):747-51. doi: 10.1086/650486. PMID: 20121411; PMCID: PMC2826599.

143. Chethana R, Mishra P, Kaushik M, Jadhav R, Dehadaray A. Effect of Smoking on Nasal Mucociliary Clearance. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg*. 2022 Oct;74(Suppl 2):956-959. doi: 10.1007/s12070-020-02026-1. Epub 2020 Aug 7. PMID: 36452767;

PMCID:

PMC9702135.

144. Prasetyo A, Sadhana U, Budiman J. Nasal Mucociliary Clearance in Smokers: A Systematic Review. *Int Arch Otorhinolaryngol.* 2021 Jan;25(1):e160-e169. doi: 10.1055/s-0040-1702965. Epub 2020 Apr 24. PMID: 33542766; PMCID: PMC7851360.
145. Baby MK, Muthu PK, Johnson P, Kannan S. Effect of cigarette smoking on nasal mucociliary clearance: A comparative analysis using saccharin test. *Lung India.* 2014 Jan;31(1):39-42. doi: 10.4103/0970-2113.125894. PMID: 24669080; PMCID: PMC3960807.
146. Wilkinson NM, Chen HC, Lechner MG, Su MA. Sex Differences in Immunity. *Annu Rev Immunol.* 2022 Apr 26;40:75-94. doi: 10.1146/annurev-immunol-101320-125133. Epub 2022 Jan 5. PMID: 34985929; PMCID: PMC9805670.
147. Spector AC, Kopka SL. Rats fail to discriminate quinine from denatonium: implications for the neural coding of bitter-tasting compounds. *J Neurosci.* 2002 Mar 1;22(5):1937-41. doi: 10.1523/JNEUROSCI.22-05-01937.2002. PMID: 11880524; PMCID: PMC6758880.
148. Ziegler F, Steuer A, Di Pizio A, Behrens M. Physiological activation of human and mouse bitter taste receptors by bile acids. *Commun Biol.* 2023 Jun 7;6(1):612. doi: 10.1038/s42003-023-04971-3. PMID: 37286811; PMCID: PMC10247784.
149. Yahaya B. Understanding cellular mechanisms underlying airway epithelial repair: selecting the most appropriate animal models. *ScientificWorldJournal.* 2012;2012:961684. doi: 10.1100/2012/961684. Epub 2012 Sep 23. PMID: 23049478; PMCID: PMC3461624.
150. Ohnishi T, Okubo K. Isolation of pure human mucosal epithelium for RNA analysis. *Biotechniques.* 1999 Nov;27(5):978-80, 982-4, 986. doi: 10.2144/99275st06. PMID: 10572647.
151. Amosu M, Gregory AJ, Murtagh JD, Pavin N, Meyers CT, Grano de Oro Fernandez J, Moore K, Maisel K. Mechanical Dissociation of Tissues for Single Cell Analysis Using a Motorized Device. *J Vis Exp.* 2023 Nov 10;(201). doi: 10.3791/65866.

PMID:

38009740.

152. Alva N, Palomeque J, Carbonell T. Oxidative stress and antioxidant activity in hypothermia and rewarming: can RONS modulate the beneficial effects of therapeutic hypothermia? *Oxid Med Cell Longev*. 2013;2013:957054. doi: 10.1155/2013/957054. Epub 2013 Dec 2. PMID: 24363826; PMCID: PMC3865646.

10. Veröffentlichung

Originalarbeit

Hollenhorst MI*, **Husnik T***, Zylka M, Duda N, Flockerzi V, Tschernig T, Maxeiner S#, Krasteva-Christ G#. Human airway tuft cells influence the mucociliary clearance through cholinergic signalling. *Respir Res.* 2023 Nov 4;24(1):267. doi: 10.1186/s12931-023-02570-8. PMID: 37925434; PMCID: PMC10625704.

*Geteilte Erstautorenschaft, #Geteilte Letztautorenschaft

Die Forschungsarbeit mit dem Titel „Human airway tuft cells influence the mucociliary clearance through cholinergic signalling“ wurde am 4. November 2023 im renommierten Journal *Respiratory Research*, welches von BMC - Springer Nature herausgegeben wird, veröffentlicht. Die Publikation ist unter folgendem Link zugänglich: <https://respiratory-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12931-023-02570-8> (Zugriff am 29.03.2024).

11. Dank

Zuallererst möchte ich Frau Prof. Dr. Krasteva-Christ meinen tiefsten Dank aussprechen. Sie haben mir die einzigartige Möglichkeit gegeben, diese Arbeit durchzuführen und mich in jeder Phase der Doktorarbeit unterstützt. Es war nicht immer einfach, und oft wusste ich nicht weiter, aber Sie standen immer hinter mir und haben die beste Leistung aus mir herausgeholt.

Ein besonderer Dank gilt auch Dr. Monika Hollenhorst, die mich stets betreut hat und mir bei jedem Schritt eine große Hilfe war – sowohl in der praktischen Arbeit als auch in der Theorie. Ihre Unterstützung war von unschätzbarem Wert. Für viele ausgezeichnete Ratschläge, tolle Gespräche und eine einzigartige Betreuung möchte ich mich ebenfalls bei Dr. Stephan Maxeiner bedanken. Danke euch beiden, dass ihr stets an mich geglaubt habt und immer nur das Beste für mich wolltet.

Mein Dank gilt auch der gesamten Arbeitsgruppe Krasteva-Christ für das großartige Arbeitsumfeld und die kontinuierliche Unterstützung. Ein spezielles Dankeschön geht an Prof. Dr. Thomas Tschernig, der mir den Zugang zu den Körperspendern ermöglicht hat und somit diese Arbeit erst möglich gemacht hat.

Weiter möchte ich mich bei meiner besten Freundin, größten Unterstützerin und Lebensgefährtin Janina Lang bedanken, die mich jeden Tag unterstützt hat und mir immer zur Seite stand, wenn ich es gebraucht habe. Abschließend möchte ich meiner Familie danken, die mir ermöglicht hat, hier zu studieren, stets an mich geglaubt und mich nie im Stich gelassen hat. Das alles habe ich nur dank euch geschafft.

Ich musste viel für dieses Studium opfern, aber ich weiß, dass es sich gelohnt hat. An die nächste Generation möchte ich weitergeben: *"Wenn du es dir vorstellen kannst, kannst du es auch schaffen. Nichts ist unmöglich!"*

Ich habe es geschafft, Opa. Ich hoffe, dass du das siehst und stolz bist.

12. Lebenslauf

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